

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Alexandra Urbančoková

Detekce genetických modifikací asociovaných s pankreatickým adenokarcinomem

Detection of genetic modifications associated with pancreatic adenocarcinoma

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Katarína Smolková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.08.2021

Podpis

Podakovanie

Ďakujem svojej školiteľke RNDr. Kataríne Smolkovej, Ph.D za odborné vedenie tejto práce, za jej čas, odborné rady a sprostredkované skúsenosti. Vážim si jej podporu, priateľský prístup, ochotu a trpezlivosť.

Rada by som tiež poďakovala ďalším členom oddelenia, ktorým vďačím za cenné rady a konzultácie, najmä Mgr. Jitke Špačkovej, Ph.D.

Ďakujem aj rodine a priateľom za ich psychickú podporu a trpezlivosť.

Táto práca bola realizovaná v rámci projektu AZV číslo grantu NV19-01-00101 s názvom „Nádor pankreatu: metabolické zmeny asociované s inzulínovou rezistencií“.

Abstrakt

Pankreatický duktální adenokarcinom (PDAC) patří k nejčastějším důvodům úmrtí na nádorové onemocnění a tento trend se bude v budoucnu zhoršovat. Pěstování buněk v ex-vivo 3D kulturách ve formě organoidů představuje společně s kulturami a xenografty spolehlivý model odrážející morfologii a histologii v samotném nádoru. Nejčastěji mutované geny vyskytující se v PDAC nádorech jsou *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* a *CDKN2A*. Cílem práce bylo stanovit mutace vyskytující se v primárních organoidech odvozených z lidských PDAC. Za tímto účelem jsme vyhledávali studie v online genomických databázích, které obsahují data z PDAC a stanovili jsme geny a konkrétní mutace vhodné pro další analýzu. Navrhli jsme postup detekce s pomocí Sangerovi metody sekvenování, který byl optimalizovaný na buněčných liniích. S využitím metod PCR a western blotu byly stanoveny alternace v analyzovaných genech ve vzorcích odvozených od tkání pacientů, pěstovaných ex-vivo v 3D kulturách. Následně byla navrhnutá zlepšení, která by vedla k větší citlivosti detekce. Připravená mutační analýza bude využívána při analýze dalších organoidů odvozených ze vzorků PDAC pacientů a získaná data budou sloužit k stratifikaci metabolomických dat získaných z těchto vzorků.

Klíčová slova:

PDAC, mutační analýza, ex-vivo kultury, *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a serious oncological disease, which ranks among cancers with the worst prognosis and a three-year life expectancy of 10%. Ex-vivo organoid cultures derived from cancer tissue are popular and reliable research models, which reflect the morphology and histology of the original tissue. Genetic background leading to development PDAC confer typical alterations in genes KRAS, TP53, SMAD4 a CDKN2A. The aim of this thesis was to determine mutations present in organoid cultures derived from human PDAC. We used online genomic databases to estimate specific mutations typical for PDAC. Based on that research we designed protocols for the detection of PDAC genetic alterations and optimized those methods using cultured cells. We applied the approach on primary ex-vivo organoids derived from surgical cancer specimens and detected mutations in KRAS, TP53, SMAD4, or deletion of exons in CDKN2A. Alternatively, we proposed improvements for the analysis of genetic background in PDAC. The data obtained within this thesis will be used for the stratification of metabolomics and biochemical analyses further in the project.

Key words:

PDAC, mutational analysis, *ex-vivo* cultures, *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*

Obsah

Zoznam použitých skratiek	7
1 Úvod	9
2 Literárny prehľad	10
2.1 PDAC	10
2.2 Genetické pozadie PDAC	14
2.2.1 Vznik PDAC	14
2.2.2 KRAS	16
2.2.3 TP53	19
2.2.4 SMAD4	23
2.2.5 CDKN2A	24
2.3 Kachexia	25
2.4 3D in vitro modely	27
3 Cieľ práce	28
4 Materiál a metódy	29
4.1 Materiál	29
4.2 Súbor pacientov	30
4.3 Izolácia DNA z bunkových línií a z <i>ex-vivo</i> pestovaných kultúr	30
4.4 <i>In silico</i> analýza	31
4.5 Návrh primerov pre PCR a sekvenáciu	31
4.6 PCR	39
4.7 DNA elektroforéza	41
4.8 Prečistenie PCR reakcie	42
4.9 Sekvenovanie podľa Sangera	42
4.9.1 Analýza sekvenogramov	43
4.10 Lyzovanie buniek z bunkových línií a z <i>ex-vivo</i> pestovaných kultúr	43
4.11 Stanovenie množstva proteínu lyzátov	43
4.12 SDS elektroforéza a western blot	43
5 Výsledky	46
5.1 Analýza genomických databáz	46
5.1.1 <i>In silico</i> analýza genetických alternácií génov <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , <i>SMAD4</i> , <i>CDKN2A</i>	47
5.1.2 <i>In silico</i> analýza mutácií v bunkových líniách	51
5.2 Optimalizácia zvolenej analýzy.....	52
5.2.1 Optimalizácia PCR.....	52
5.2.2 Prečistenie reakcie a sekvenácia	56
5.2.3 Detekčná hranica mutácií u vzoriek s heterogénnym pozadím	56

5.3	Analýza vzoriek z primárných organoidov PDAC	57
5.3.1	KRAS	57
5.3.2	TP53	58
5.3.3	SMAD4	60
5.3.4	CDKN2A	61
5.4	Analýza western blotom	62
6	Diskusia	64
6.1	In silico analýza.....	64
6.2	Optimalizácie analýzy	65
6.3	Alternácie u vzoriek <i>ex-vivo</i> kultúr organoidov.....	66
7	Súhrn	70
8	Použitá literatúra	71

Zoznam použitých skratiek

ADM	acinar to ductal metaplasia
Akt	AKT serine/threonine kinase
Atgl	adipose triglyceride lipase
AV ČR	Akadémia vied Českej republiky
BC	bunkový cyklus
BCA	bicinchoninová kyselina
BMI	body mass index
bp	páry bází
BSA	hovedzí sérový albumin
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CoA	Koenzym A
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	„epithelial-mesenchymal transition“
FNKV	Fakultnej nemocnici Královské Vinohrady v Prahe
FWD	forward
GAP	hydrolyzačné faktory z angl. „GTPase activating proteins“
GEF	výmenné faktory z angl. „Guanin nucleotide exchange factors“
GOF	stabilizácia mutácia z angl. „gain of function“
Hsl	hormone-sensitive lipase
IL-6	interleukin 6
IPMN	intraduktálna papilárna mucinózna neoplázia
JAK	Janus kinase
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
LOH	strata heterozygosity, z angl. „lost of heterozygosity“
M	štandard molekulových hmotností
MAPK	mitogénmi aktivované proteín kinázy
MDM2	MDM2 proto-oncogene
ME2	malic enzyme 2
MM	master mix

NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	negatívna kontrola
PanIN	pankreatická intraepiteliálna neoplázia
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDAC	Pankratický duktálny adenokarcinóm
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR β	platelet derived growth factor receptor beta
Pdk1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PK	pozitívna kontrola
pRB	retinoblastomový proteín
REV	reverse
ROS	reaktívne formy kyslíku, z angl. reactive oxygen species
RT	izbová teplota, z angl. room temperature
SMAD4	SMAD4 family member 4
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TF	transkripčný faktor
TGF β	transforming growth factor β
T _m	teplota nasadania primerov
TP53	tumor protein p53
TS	tumor supresor
WB	western blot
wt	divoký typ z angl. „wild type“

1 Úvod

Nádorové ochorenia postihujú ľudí na celom svete. PDAC patrí medzi najčastejšie príčiny úmrtia na rakovinové ochorenia vôbec. V súčasnej dobe neexistuje žiadna účinná metóda liečby, poprípade efektívny spôsob včasnej detekcie tohto závažného ochorenia. Rakovinové ochorenie je ochorenie genetické, založené na postupnom hromadení genetických alternácií, vďaka ktorým nádorové bunky získavajú prevahu. Typické znaky rakovinových buniek sú definované ako tzv. „hallmarks of cancer“ (Hanahan and Weinberg, 2011). V PDAC sú typické genetické alternácie v génoch *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* a *CDKN2A* (Di Marco et al., 2015; Seino et al., 2018). Ďalším veľmi častým problémom spojeným s nástupom či rozvojom (nielen) PDAC je systémové metabolické ochorenie, tzv. rakovinová kachexia. Pacienti s nádorovou kachexiou trpia úbytkom hmotnosti dôsledkom nadmerného odbúravania tuku aj kostrových svalov a poruchou príjmu potravy, čo má za následok prípadné komplikácie spojené s efektívnym dávkovaním liečby.

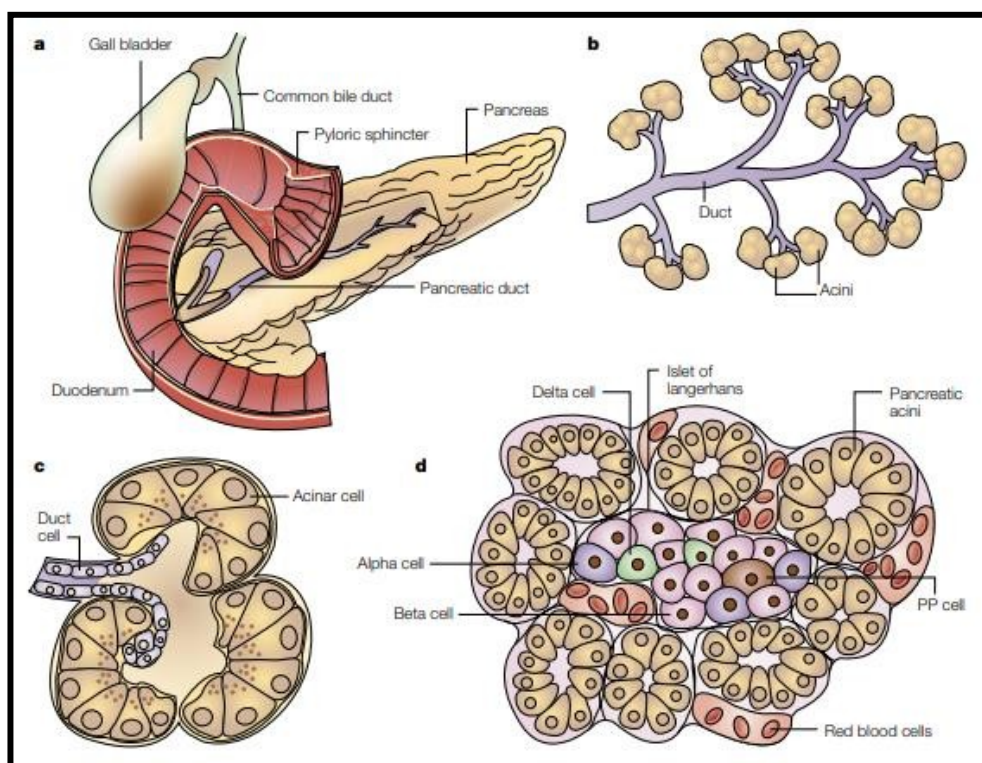
Genetické zmeny sú často špecifické pre určité typy nádorov. PDAC nie je výnimkou. Za využitia rozsiahleho množstva dát zo vzoriek pacientov po celom svete, získaných z webových portálov genomických databáz, je možné vysledovať alternačné vzorce *in silico* analýzou a určiť postup pre ich detekciu v samotných vzorkách *ex-vivo* pestovaných buniek. Úlohou tejto diplomovej práce bolo navrhnúť a optimalizovať cielenú analýzu genetických alternácií v PDAC vzorkách, kultivovaných formou tzv. organoidov. Pestovanie primárnych kultúr odvodených od resekovaných tkanív pacientov v *ex-vivo* 3D kultúrach predstavuje prostredie veľmi blízke prostrediu v samotnom nádore, preto je tento model v poslednej dobe často využívaný.

Výsledkom tejto práce je optimalizovaný postup genetickej analýzy, ktorý bude ďalej využitý na ostatných vzorkách PDAC, ktoré sú kontinuálne prijímané do tejto štúdie. Získané dáta budú použité pre stratifikáciu metabolických a biochemických dát získaných z tých istých vzoriek s cieľom odhaliť metabolický charakter nádoru spojený s nádorovou kachexiou.

2 Literárny prehľad

2.1 PDAC

Pankreas je žľaza podieľajúca sa na spracovaní potravy organizmom. Anatomicky sa člení na hlavu (najväčšia časť), telo a chvost. Má endokrinnú časť, kde sa tvoria hormóny (inzulín, glukagon a somatostatin) s funkciou udržovania hladiny glukózy v krvi a exokrinnú, ktorá napomáha tráveniu v tenkom čreve tvorbou enzýmov trypsinogén, chymotrypsinogén, amyláza, lipáza a ďalších. Endokrinná časť je tvorená α , β , δ , ϵ a PP bunkami (Budipitojo et al., 2016; Kim et al., 2009) exokrinná časť sa skladá z akinárnych a duktálnych buniek (Bardeesy and DePinho, 2002).



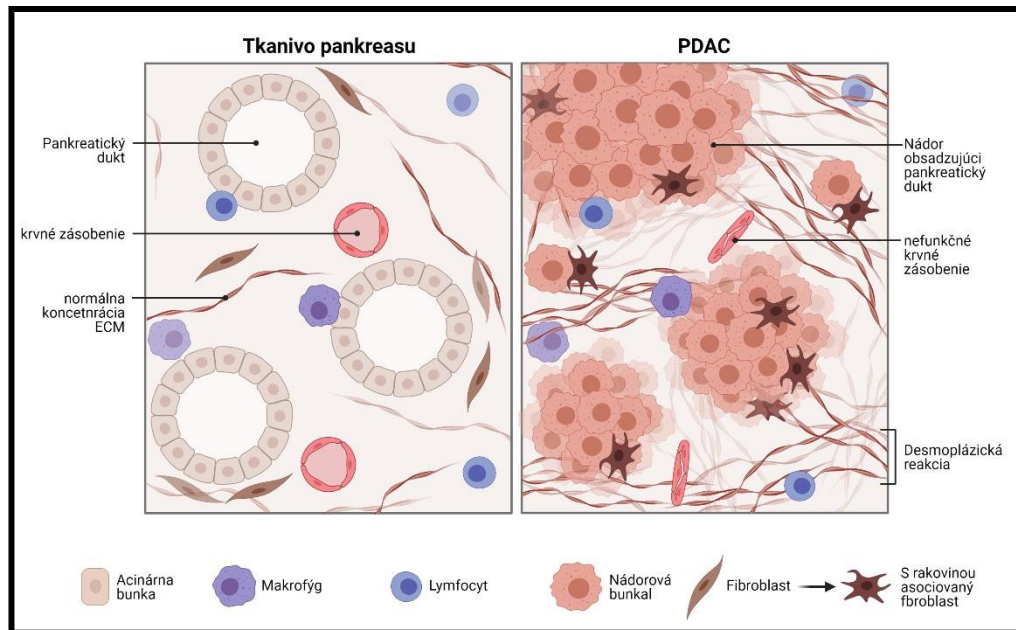
Obrázok č. 1: Zobrazenie pankreasu a jeho anatomickej stavby (A) exokrinná časť pankreasu (B) stavba samotnej akini (C) bunkové zloženie endokrinnnej časti (D). Upravené podľa (Bardeesy and DePinho, 2002).

Častými ochoreniami pankreasu sú chronická pankreatitída a tiež nádorové ochorenia. Rakovinové ochorenia bývajú minoritne odvodené od endokrinnnej časti pankreasu a to asi v 5 % všetkých pankreatických nádorov, kedy vzniká pankreatický neuroendokrinný tumor. Až 85 % pankreatických nádorov vzniká z exokrinnnej časti pankreasu. Tieto nádory sú označované ako pankreatický duktálny adenokarcinóm (PDAC) (Rawla et al., 2019).

PDAC patrí k jedným z najnebezpečnejších onkologických ochorení vôbec. Závažnosť ochorenia odzrkadľuje relatívne nízke dožívania sa pacientov. Jedného roka od diagnostikovania sa dožije približne 31 % pacientov, troch rokov 12 % a len menej ako 9 % pacientov sa dožije piatich rokov od diagnostikovania (<https://bit.ly/3A9nrfl>). Postihuje rovnako často ženy aj mužov. PDAC zastáva piate miesto v rebríčku najčastejších príčin úmrtia na nádorové ochorenia a je pravdepodobné, že v budúcnosti sa pankreatické nádory zaradia do popredia k nádorom pľúc a kolorekta, keďže je toto ochorenie vysoko agresívne a na rozdiel od kolorektálneho, pľúcneho karcinómu a rakoviny prsníka neexistuje účinná liečba a včasná diagnostická metóda. Taktiež dochádza k znižovaniu výskytu niektorých nádorových ochorení, vďaka zmenám správania spoločnosti. Medzi takéto ochorenia patria napríklad nádory pľúc a kolorekta nachádzajúce sa v rebríčku nad PDAC (Ferlay et al., 2016; Siegel et al., 2020; Sung et al., 2021).

Vznik, rozvoj a priebeh ochorenia PDAC je spájaný s mnohými rizikovými faktormi, medzi ktoré patrí nadváha (Calle et al., 2003), hyperglykémia (Rahn et al., 2018), požívanie alkoholu (Gapstur et al., 2011; Zhang et al., 2017), fajčenie (Delitto et al., 2016) a rodinná anamnéza (Hassan et al., 2007). Chronická pankreatitída je progresívne chronické zápalové ochorenie pankreasu vedúce k strate jeho funkcie fibrózou (Braganza et al., 2011). Vyvinie sa asi u 8 z 100 000 ľudí ročne (Díte et al., 2001) a jej prítomnosť prináša taktiež riziko vytvorenia nádorového ochorenia pankreasu (Logsdon et al., 2003; Lowenfels et al., 1993).

PDAC je významné svojím veľkým nádorovým stroma, ktoré predstavuje až 90 % masy nádoru. Nádorové bunky sú obklopené bunkami stromatu, konkrétne fibroblastami, pankreatickými stelátovými bunkami a extracelulárnou hmotou zloženou z kolagénu I a III, fibronektínu a ďalších proteínov a populáciou imunitných buniek (Öhlund et al., 2017). Zloženie nádorovej stróma má vplyv na progres a prognózu ochorenia (Wang et al., 2021) a zníženú citlivosť k liečbe (Rasheed et al., 2012). Tkanivo pankreasu a jeho zmeny pri PDAC sú zobrazené v **obrázku č. 2**.

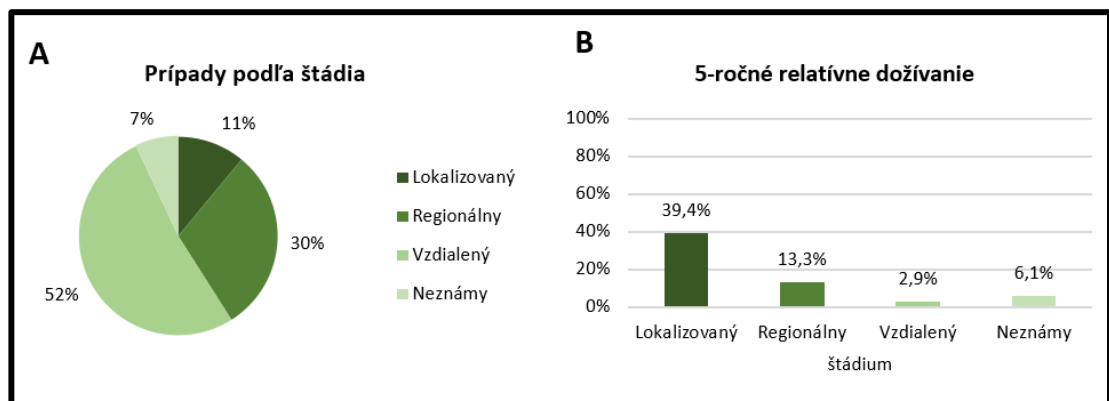


Obrázok č. 2: Zobrazenie histológie pankreasu (vľavo) a zmeny, ku ktorým dochádza v PDAC (vpravo). Vytvorené s BioRender.com

Primárny tumor je zmes subklonálnych populácií buniek, ktoré môžu dávať vznik sekundárnym nádorom (Yachida et al., 2010). Vzniku nebezpečných sekundárných lézií predchádza niekoľko postupných krokov a len niektoré bunky, ktoré nadobudnú progresívne mutácie, sú schopné ju založiť (Yachida et al., 2010). Súčasťou procesu je transdiferenciácia buniek. Dochádza k procesu nazývanému „epithelial-mesenchymal transition“ (EMT) pri ktorom epiteliálna bunka nádoru modifikuje expresiu adhézných molekúl na svojom povrchu a je schopná migrovať do odľahlých častí tela. Pred založením sekundárneho ložiska musí byť tento proces obrátený a dochádza k „mesenchymal-epithelial transformation“ (Gonzalez and Medici, 2014). Metastáze sa môžu vyskytovať už v začiatkoch nádorového rastu (Mao, 1995). Je vysoká pravdepodobnosť, že už pri diagnostikovaní PDAC pacientovi, sa u neho vyskytuje invazívna forma ochorenia (Haeno et al., 2012). Typické sekundárne ložiská PDAC sú pečeň, pľúca a peritoneum (Katz et al., 2009; Sahin et al., 2018; Yachida et al., 2010). Menej často sa vyskytujú v pleure, kostiach, nadobličkách a iných orgánoch (Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2009).

Odhalenie prítomnosti nádoru býva, z dôvodu problematickej a invazívnej diagnostickej metódy, až vo vysokom štádiu progresie. V závislosti na stave pacienta a ochorenia v čase diagnostikovania sa odvíja ďalší postup liečby. U menej ako 20% pacientov je možné nádor chirurgicky odstraňovať, čo je stále považované za najefektívnejšiu formu

terapie. Úspešnosť resekcie rapídne klesá so zvyšujúcim sa štádiom ochorenia (Latenstein et al., 2020; Sener et al., 1999). Pacientov v pokročilom štádiu už nie je možné operovať. Pacientom po resekcii sa podáva aj systémová chemoterapia a následne chemoradiačná terapia. Podáva sa aj gemcitabine či fluorouracil s radiáciou (Cruz et al., 2014). Folfirnox je účinný pre pacientov s metastázami (Conroy et al., 2011). Dôležitosť včasných detekčných metód je zobrazená v **obrázku č. 3**, ktorý ukazuje pomer pacientov zachytených v danom štádiu ochorenia (**obrázok č. 3A**) a prežívanie pacientov v dobe 5 rokov od diagnostikovania v závislosti na štádiu ochorenia (**obrázok č. 3B**). Skorá detekcia prináša aj lepšiu prognózu. Z toho dôvodu je najväčší dôraz kladený hľadaniu možností včasnej detekcie ochorenia. Od vytvorenia prvej nádorovej bunky až po formovanie metastáz prebehne 7 rokov (Yachida et al., 2010). Tento čas predstavuje najúčinnnejšie zásahové okno pre diagnózu a liečbu PDAC (Yachida et al., 2010).



Obrázok č. 3: Grafy zobrazujúce štádium ochorenia, v ktorom bolo u pacientov diagnostikované spolu s percentuálnym zastúpením (A). Graf zobrazujúci percentá pacientov s daným štádiom ochorenia a ich relatívne dožívanie sa 5 rokov od diagnostikovania (B). Použité delenie: lokalizovaná forma: nález výhradne v primárnom ložisku, regionálne štádium: ochorenie rozšírené do regionálnych lymfatických uzlín, vzdialené štádium: vyskytujú sa metastázy, neznáme: nedefinované štádium. Upravené z <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>

Možnosti terapie PDAC sú obmedzené a bunky PDAC vykazujú rezistenciu k štandardnej liečbe, za ktorou stojí napríklad pozmenený metabolizmus terapeutických látok a enzýmy, ktoré sa týchto procesov zúčastňujú (Capurso and Sette, 2019). Tiež významný vplyv na účinnosť liečby má aj fakt, že bunky sa často nachádzajú v hypoxickom stave vďaka nádorovej stróme, čo im umožňuje lepšie odolávať rádioterapii a chemostatikám (Koong et al., 2000). Pri liečbe je preto kladený najväčší dôraz na zmiernenie symptómov a zlepšenie kvality života, najmä pri pacientoch s pokročilým stupňom ochorenia tzv. paliatívna starostlivosť (Choi et al., 2021).

2.2 Genetické pozadie PDAC

Aby sa zo zdravých buniek pankreasu stali transformované rakovinové bunky, musí dôjsť k zmenám vo forme mutácií a ich postupnému hromadeniu. Týmto prechodom niektoré bunky môžu získavať proliferačné výhody. Najčastejšie sa vyskytujúce mutácie v PDAC sú v génoch *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* a *CDKN2A* (Di Marco et al., 2015; Seino et al., 2018) (pozri kapitola 5.1, **obrázok č. 14**).

2.2.1 Vznik PDAC

Formovanie PDAC je proces následných krokov, kde na začiatku stoja neinvazívne prekursori líšiaci sa svojou morfológiou. Popísané sú nasledovné prekursori: 1) pankreatická intraepiteliálna neoplázia (PanIN); 2) mucínová cystická neoplázia (MCN); 3) intraduktálna papilárna mucinózna neoplázia (IPMN) (Hruban et al., 2008; Maitra et al., 2005; Ren et al., 2019); 4) intraduktálna tubulopapilárna neoplázia (ITPN) (Ren et al., 2019). Najčastejšie sa vyskytujúcim prekursorom PDAC je PanIN (Kanda et al., 2012).

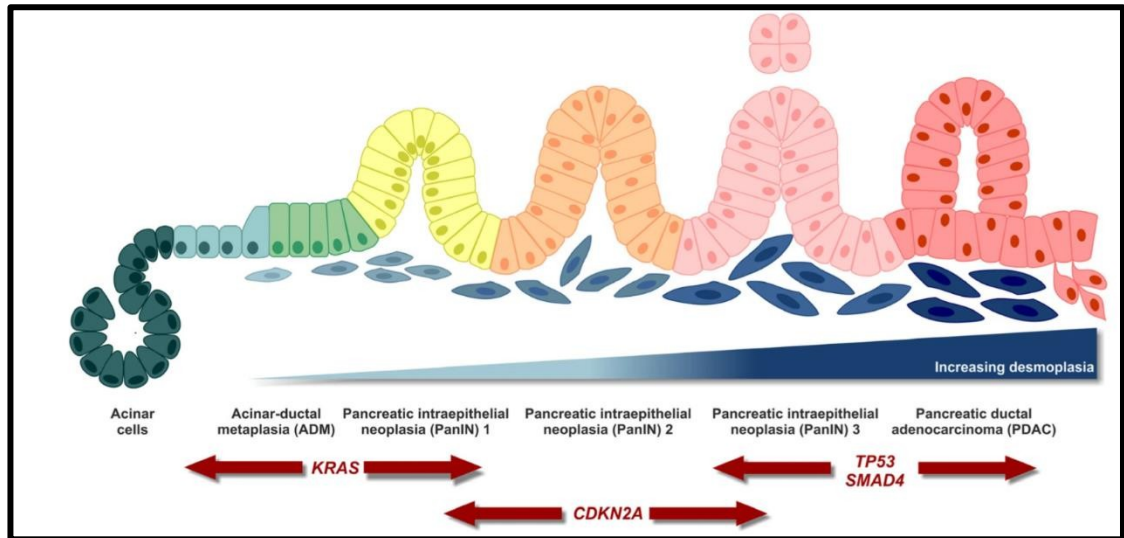
Prekursori sú delené na tri stupne dysplázie: malá, stredná a vysoká. PanIN v malom stupni dysplázie sú bežné a ich výskyt narastá s pribúdajúcim vekom, avšak nedochádza automaticky k rakovinovej transformácii. K progresii lézií až k vysokému stupňu dysplázie je nutná akumulácia genetických zmien (Ren et al., 2019). Lézie patriace do prvých dvoch skupín (malý a stredný stupeň) sú považované za málo rizikové, k ich malígnej progresii dochádza zriedka, avšak dysplázie vo vysokom stupni sú považované za rizikové a je vhodné ich operatívne odstraňovanie (Kanda et al., 2012). Vznikajú najmä v hlave pankreasu (Hruban et al., 2008) a predstavujú mikroskopické nálezy, pri ktorých sa objavuje problém ich včasnej vizualizácie.

Dlho nebolo jasné, v ktorých bunkách pankreasu dochádza k iniciácii onkogenézie. Vzhľadom na duktálny charakter buniek PDAC boli za prekursor považované bunky duktálne. S bližšími poznatkami sa za bunky, ktoré prešli onkogéziou a dávajú vznik PDAC považujú ako duktálne, tak bunky akinárne. V prípade duktálneho pôvodu predchádza PDAC neinvazívna lézia IPMN (Kopp et al., 2018). PanIN lézie sú odvodené od akinárnych buniek pankreasu a k tomuto procesu dochádza častejšie. Akinárne bunky prejdú transdiferenciáciou, nazývanou „acinar to ductal metaplasia“ (ADM) (Yamaguchi et al., 2018) a to tak, že spustením dráhy, najčastejšie onkogénnou mutáciou *KRAS* vzniká z akinárnej bunky bunka „ductal-like“ a tá môže dať vznik PanIN lézii (Guerra et al., 2007; Kopp et al., 2012). Proces ADM nie je nutne spojený s vznikom lézií, dochádza k nemu aj počas poškodenia pankreasu a nemusí viesť k tvorbe lézií (Kopp et al., 2012).

Model postupného vzniku karcinómu je odvodený od pozorovaní na geneticky modifikovaných myšich modeloch (Hingorani et al., 2003; Tu et al., 2019). Endogénna expresia mutantej formy K-Ras^{G12D} v pankreasoch modelov rekapituluje vznik PanIN. Progresia neinvazívnych lézií u malej časti testovaných subjektov postúpila až k vzniku invazívnych adenokarcinómov a tvorbe metastáz. To znamená, že ak je prítomná samotná onkogénna mutácia K-Ras, nádorová progresia sa v drvivej väčšine prípadov zastavuje v štádiu PanIN (Hingorani et al., 2003). Frekvencia mutácií v géne *KRAS* je vysoká už v prekurzoroch PDAC a s postupom dysplázie sa ich výskyt mierne zvyšuje. V neinvazívnych léziách býva podiel mutovaných alel nízky (20 %), ktorý sa taktiež progresívne zvyšuje s postupom ochorenia (Kanda et al., 2012). Menšina lézií, ktorá vzniká iným iniciačným mechanizmom (lézie s divokým typom (wt z angl. „wild type“) *KRAS*), nesie počiatočnú alternáciu napríklad v géne *BRAF*, *CDKN2A* alebo *GNAS* (Kanda et al., 2012).

Nadmerná aktivita onkogénu K-Ras (mutovaného) uvádza bunky do permanentného zastavenia bunecného cyklu (BC), senescencie (Serrano et al., 1997). Indukciou pomocou endogénnej expresie Trp53^{R172H} (mutovaná forma v myšom modeli, ekvivalent u človeka je mutácia R175H) a KRAS^{G12D} v myšom modeli vzniká invazívny a metastázujúci PDAC (Hingorani et al., 2005). Progresia ochorenia z PanIN lézií indukovanými mutovaným *KRAS* je podmienená ďalším zásahom, ktorým často býva inaktivácia tumor supresorového (TS) génu *CDKN2A*, *TP53* (Hruban et al., 2000; Maitra et al., 2005; Tu et al., 2019; Wilentz et al., 1998) a *SMAD4* v neskorších fázach (Maitra et al., 2005; Tu et al., 2019; Wilentz et al., 2000). Postupným

prechodom lézii je možné pozorovať rastúcu proliferáciu buniek (Klein et al., 2002). Postupný model progresie PDAC je znázornený na **obrázku č. 4**.

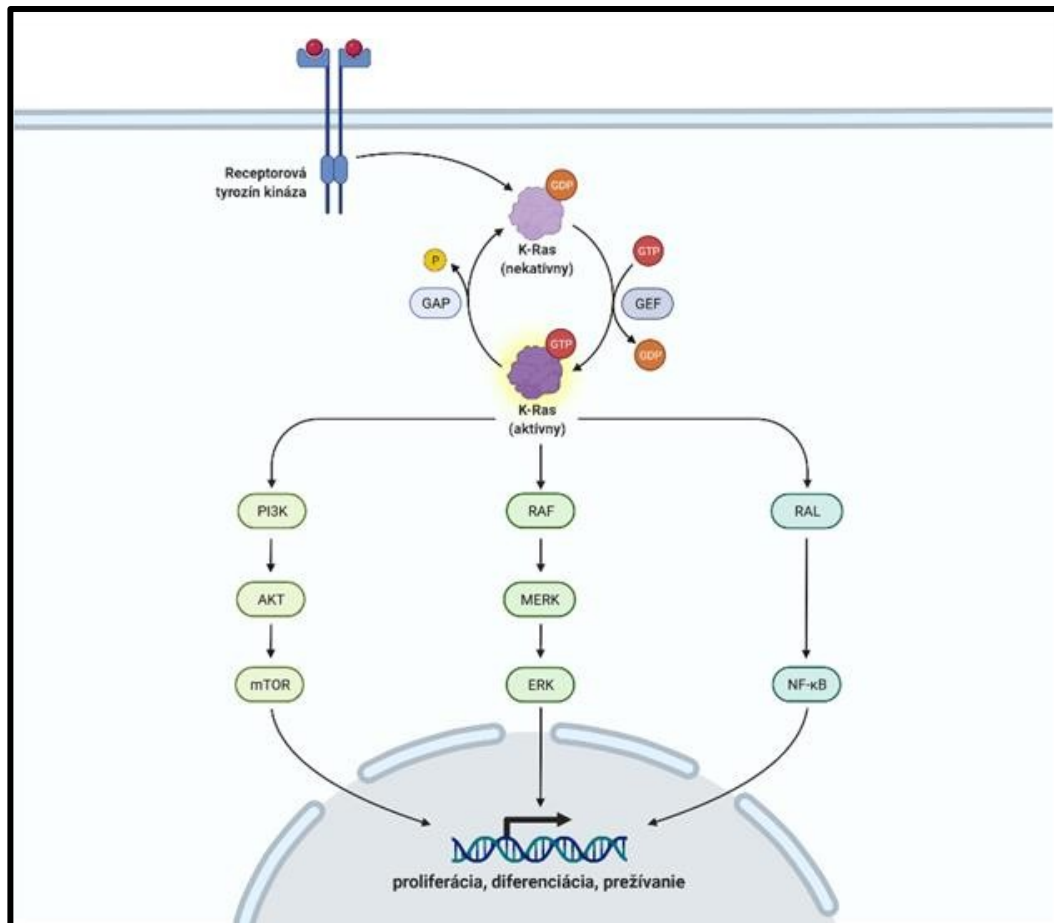


Obrázok č. 4: Proces hromadenia mutácií v akinárnych bunkách pankreasu prechádzajúci cez transdiferenciáciu na ductal-like bunky, lézie PanIN 1-3 až k PDAC zobrazené spolu s najčastejšie sa vyskytujúcimi genetickými aletrenáciami, ktoré sa hromadia so zvyšujúcou sa mierou desmoplaziou. Upravené poľa (Orth et al., 2019).

2.2.2 KRAS

Prepisom génu *KRAS* („*KRAS* proto-oncogene, GTPase“) vzniká malý G proteín K-Ras patriaci do podrodiny RAS proteínov spolu s H-Ras a N-Ras, ktorých mutácie sú často spájané s ľudskými nádormi. Mutované formy K-Ras stoja hlavne za neopláziami v oblastiach pľúc, kolorekta a pankreasu (www.oncokb.org/gene/KRAS).

Proteín je v aktívnej forme po naviazaní GTP a k inaktivovaniu dochádza hydrolýzou GTP na GDP. Reguláciu aktivity K-Ras zabezpečujú aktivačné výmenné faktory (GEFs, z angl. „Guanin nucleotide exchange factors“), a hydrolyzačné faktory (GAPs, z angl. „GTPase activating proteins“), ktoré uvedú proteín do neaktívneho stavu hydrolýzou GTP. Signalizácia K-Ras ďalej využíva tri hlavné efektorové dráhy a to Raf/Mek/Erk (MAPK), PI3K/Pdk1/Akt a Ral GEF (Eser et al., 2014). Týmito dráhami je regulovaný napríklad, proliferácia či diferenciácia buniek (Pantsar, 2020; Weinberg et al., 2010), vďaka čomu sa proteín zaraďuje medzi protoonkogény. Cyklus aktivácie a inaktivácie proteínu a dráhy, ktorých je súčasťou sú zobrazené na **obrázku č. 5**.



Obrázok č. 5: Schématické znázornenie funkcie K-Ras proteínu. Väzbou GTP proteín nadobúda schopnosť aktivovať kaskády proteínov vedúce k zmenám v proliferácii, diferenciácii a samotnom prežívaní buniek. Onkogénnou mutáciou sa rapídne znižuje miera interakcie mutovaného K-Ras s hydrolyzačným faktorom (GAP) a proteín zostáva dlhšie aktívny, tzn. vo väčšej miere aktivuje efektorové dráhy. Vytvorené s BioRender.com

K mutáciám v géne *KRAS* dochádza približne v 90 % PDAC, konkrétne k bodovým mutáciám v kodónoch 12, 13 a 61 (Cicenas et al., 2017). *KRAS* nebýva spravidla amplifikovaný (Kanda et al., 2012). Rovnováha medzi aktívnou a neaktívnou formou proteínu, zabezpečovaná špecifickými proteínmi GEF a GAP, je v PDAC menovanými bodovými mutáciami porušená. Proteín je pozmenený tak, že k interakciám s GAP dochádza v zníženej miere a K-Ras preto zostáva dlhšie aktívny s naviazaným GTP (Scheffzek, 1997), čo vedie k abnormálnemu správaniu bunky (Huang et al., 2014).

Mutácia v proto-onkogéne *KRAS* býva počiatčným faktorom vzniku PDAC (Hingorani et al., 2003). K progresii nestačí však mutácia samotná, keďže zvýšená aktivita mutovaného K-Ras indukuje v bunkách senescenciu. Tej sa bunka vyhýba inaktívaním dráhy TS (Serrano et al., 1997). Úniku buniek napomáha aj samotný K-Ras zvýšením hladiny transkripčného faktoru

(TF) Twist, čím je inaktivovaný proteín p16 a nedochádza k senescencii (Lee and Bar-Sagi, 2010). Bunky s K-Ras onkogénnou mutáciou sú však selektívne odstraňované z tkaniva, avšak tie, ktoré zostávajú, formujú premalignú léziu (Morton et al., 2010).

Vzhľadom na fakt, že progresiu nádoru sprevádzajú ďalšie alternácie, nie je možné jasne odlíšiť vplyv mutovaného K-Ras. Dráhy aktivované onkogénom K-Ras (mutovaná forma) sú významné pre podporu rozvoja a udržiavania PDAC a to konkrétne dráha RAF→MEK→ERK (Collisson et al., 2012; Zhang et al., 2014). Časť PDAC nádorov zostáva závislá na signalizácii K-Ras, alebo jej časti. Neaktívny K-Ras vtedy vedie k regresii nádoru (Collins et al., 2012; Ischenko et al., 2021). Mimo iné, mutovaná forma K-Ras napomáha PDAC bunkám vo vývoji a udržiavaní ochorenia vyhýbaním sa imunitnému systému organizmu (Ischenko et al., 2021).

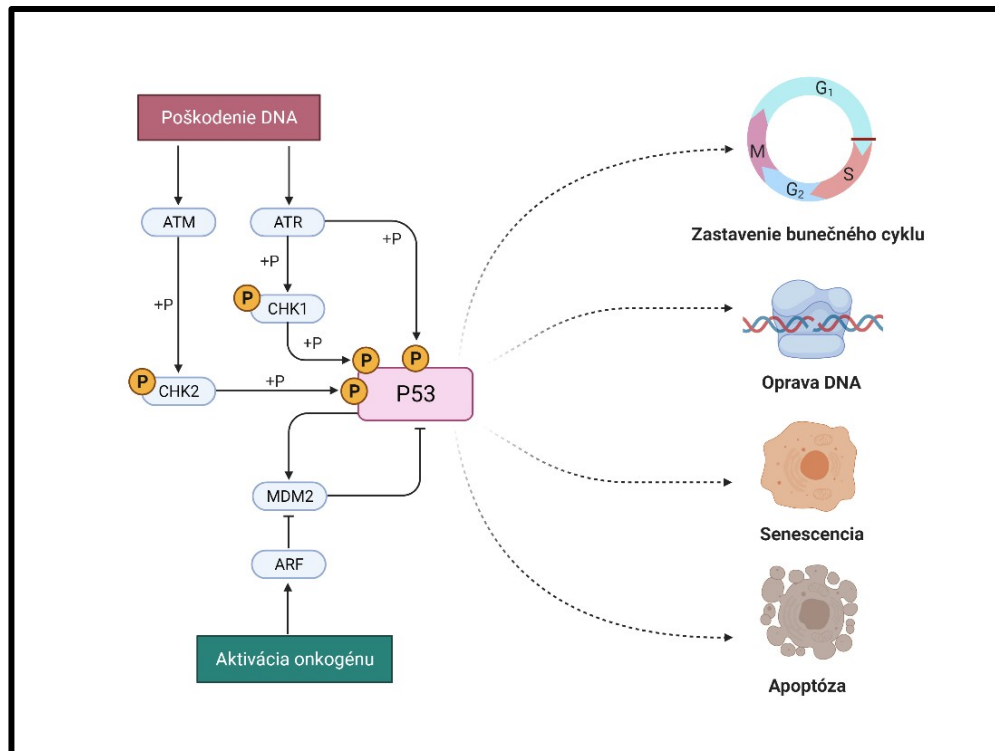
Onkogénne mutácie v *KRAS* tiež aktívne regulujú tumorový metabolizmus. V štúdií (Ying et al., 2012) ukázali významné zmeny metabolických dráh u buniek s K-Ras^{G12D}. Hlavne v metabolizme glukózy, pentózofosfátovom cykle a dráhe syntézy hexosamínov. Ďalej pozorujú využívanie glutamínu ako hlavný zdroj uhlíka (Gaglio et al., 2011; Ying et al., 2012). Podpora glykolýzy prebieha zvýšením glukózových transportérov v membránach a tiež niektorých glykolytických enzýmov (Ying et al., 2012). Zvýšenie glykolytickej dráhy nemá však vplyv na intermediáty Citrátového cyklu, čo naznačuje, že medziprodukty glykolýzy sú využívané najmä v anabolizme pri glykozilácii proteínov. Syntéza glykolypidov je dôležitá v mnohých procesoch spojených s neopláziou (napr. proliferáciou, invazívnosťou, angiogéziou a únikom pred imunitným systémom) (Ying et al., 2012). Výsledkom indukcie spomínaných dráh si bunka zabezpečí prekursorov pre syntézu RNA, DNA, tvorbu NADPH, syntézu makromolekúl, zvýšenú produkciu ROS a s tým spojenú aj ich účinnejšiu detoxifikáciu (Gaglio et al., 2011; Weinberg et al., 2010; Ying et al., 2012). Zvýšenou produkciou ROS v mitochondriách (hlavne v komplexe III), ktoré fungujú ako signálne molekuly, môže byť kontrolovaná aj proliferácia (Weinberg et al., 2010).

Ďalšou možnosťou, ako si bunky zabezpečujú dostatok živín vo vysoko konkurenčnom prostredí nádoru je lyzozomálnou aktivitou, ktorá je u buniek PDAC využívannejšia v porovnaní s normálnymi bunkami pankreasu. To úzko súvisí aj so zvýšeným výskytom autofágie, ktorá je asociovaná s nádorovým epitelom a fenotypom agresívnej malignancie (Perera et al., 2015).

Významné zmeny vzhľadom k expresii K-Ras^{G12D} boli nájdené aj v metabolizme acetyl-CoA (Carrer et al., 2019). V začiatkoch onkogenézie v *KRAS* mutovaných (p.G12D) bunkách dochádza k zvýšeniu acetyl-CoA, v prípade aktivácie K-Ras^{G12D} je primárnym zdrojom acetyl-CoA oxidácia leucínu. Acetyl-CoA z leucínu a ostatných zdrojov (glukóza, palmitát) potom smeruje do syntézy cholesterolu (mevalonátová dráha). Zvýšenie obsahu acetyl-CoA ovplyvňuje aj epigenetický stav bunky, dochádza k zvýšenému výskytu acetylovaných histónov (Carrer et al., 2019), ktorých zdrojom je acetyl-CoA.

2.2.3 TP53

Proteín p53, ktorý vzniká prepisom génu *TP53* (z angl. „tumor protein p53“), predstavuje dôležitý uzol pri odpovedi na bunkový stres. K vykonávaniu svojej fyziologickej role tvorí tetraméry. V bunke sa môže nachádzať v rôznych izoformách s mierne odlišnou funkciou (Bourdon et al., 2005). Za fyziologických podmienok sa proteín vyskytuje v bunke len vo veľmi malej miere. Dochádza k jeho interakcii s MDM2 proteínom (ubiquitín ligázou) a p53 je následne polyubiquitínovaný a označený k degradácii. V prípade bunkového stresu, MDM2 prestáva interagovať s p53. Tým p53 zostáva aktívny v bunke a ako TF, viažuci sa do „p53 response elementov“, indukuje produkciu kódujúcich aj nekódujúcich RNA (prípadne reprimuje). Bunečná odpoveď je závislá na druhu a intenzite stresu (Bourdon et al., 2005; Fischer, 2017). Podľa neho je vytvorená odpoveď vo forme zástavy BC, senescencie alebo až programovanej bunečnej smrti (**obrázok č. 6**). Príkladmi proteínov s „p53 response elementom“ sú p21, MDM2 a ďalšie zhrnuté v práci (Fischer, 2017). Regulácia bunkovej odpovede na stres je vykonávaná aj priamo prostredníctvom interakcií p53 s ďalšími proteínmi, najmä mitochondriálnymi (Chipuk, 2004; Frank et al., 2011).



Obrázok č. 6: Funkcia p53 po aktivácii kaskádou proteínov indukovanej poškodením DNA alebo aktiváciou onkogénu, dochádza k jeho fosforylácii, proteín nie je rozpoznávaný ubiquitín ligázou MDM2 a degradovaný. Aktívny p53 reguluje expresiu génov v bunecných procesoch ako prechod bunecným cyklom, oprava poškodenej DNA, prípadne smrť bunky. Vytvorené s BioRender.com.

Ku genetickým alternáciám *TP53* dochádza často naprieč všetkými typmi nádorových ochorení (<https://dcc.icgc.org/projects>). V nádorových bunkách sa vyskytuje viacero spôsobov akými je alternovaný. K missense mutáciám dochádza po celom géne, ale v 80 % prípadov je mutovaná oblasť DNA-väzobnej domény (DBD z angl. „DNA-binding domain“). Hotspot miesta so zvýšenou frekvenciou alternácií je možné odlišiť u PDAC nádorov v aminokyseline číslo 248 a 273, čo tvoria proteín vykazujúci zmeny v interakcii s DNA oproti wt forme. Alternáciami v aminokyseline číslo 175, 245, 249 a 282 vzniká proteín defektný v tvorbe fyziologickej konformácie. Boli zaznamenané aj prípady mutovaných p53, u ktorých sa objavujú obe možnosti súčasne (Brady and Attardi, 2010). K nonsense mutáciám dochádza len v malej miere. Všeobecne sú časté missense mutácie proteínu, menej dochádza k jeho deletovaniu (<https://bit.ly/2VmqlR>). Boli experimentálne porovnávané myšie modeli s mutovanou formou proteínu a myšie modeli s deletovaným *TP53*. Oba modeli porovnateľne podporujú

vyhnutie sa K-Ras^{G12D} indukovanej senescencii, ale len subjekty s mutovanou formou p53 vykazovali progresiu ochorenia vedúcu až k metastázam (Morton et al., 2010).

Mutované formy proteínu v prípade heterozygotnej mutácie vykazujú dominantne negatívny efekt (Willis et al., 2004), čo znamená, že mutovaná forma prejavuje svoj fenotyp a druhá, wt alela nepostačuje na udržanie fyziologických podmienok v bunke. Mutované formy proteínu vykazujú vyššiu stabilitu ako wt formy (Willis et al., 2004). V neskorších fázach postupu ochorenia dochádza k strate heterozygoty (LOH, z angl. „lost of heterozygosity“) a teda k strate druhej, nemutovanej alely. Za týchto okolností sa môže prejavíť nadobudnutá vlastnosť mutovaného p53 (GOF z angl. „gain of function“). Prítomnosť jednej alely wt formy p53 dokáže do určitej miery aktivovať proteín p21 (indukcia zástavy BC). Pomocou LOH je funkcia wt p53 potlačená úplne a bunka je schopná sa senescencii úplne vyhnúť. LOH je spojená s chromozomálnou nestabilitou (Ghaleb et al., 2020), ktorá je prítomná u metastatických, ale aj primárnych lézií. Táto nestabilita umožňuje vznik ďalších mutácií čím bunky môžu nadobúdať ďalšie výhody nádorového rastu (Ghaleb et al., 2020; Hingorani et al., 2005; Weissmueller et al., 2014).

Vzhľadom k množstvu popísaných fenotypov spôsobených mutáciou *TP53*, nie je celkom jasný mechanizmus, akým expresným programom p53 podporuje rakovinový rast. Napríklad, v štúdií (Andrysiak et al., 2017) autori multi-omics analýzou testovali nádorové bunkové kultúry, v ktorých aktivovali p53 proteín pomocou inhibovania interakcie p53-MDM2. Identifikovali transkripciu cca 100 génov, ktoré boli zaradené do kategórií regulujúcich apoptózu, indukciu zastavenia BC, diferenciáciu, metabolizmus, signálnu transdukciu, DNA opravy, autofágiu a ďalšie gény s neznámou funkciou (Andrysiak et al., 2017).

Ďalšou otázkou ohľadne hotspot mutácií *TP53* je, akým spôsobom vlastne dochádza k LOH, a akým spôsobom dochádza ku stabilizácii mutácie v onkogenézii (GOF). Pôvodné reporty naznačovali tzv. „dominant-negative“ funkciu mutovanej alely voči wt alele. V práci (Alexandrova et al., 2017) testovali tvorbu nádorov prsníka a sarkómov s pomocou *TP53^{R248Q}/WT* a *TP53⁻/WT* myši a zistili, že efektívnejšie sa tvoria nádory s mutovaným p53. Mechanizmus LOH u *TP53* nie je celkovo známy (Alexandrova et al., 2017).

Nádory s missense mutáciou vykazujú horšiu prognózu než nádory s deletovaným p53 (Maddalena et al., 2021). V týchto nádoroch zároveň zistili zníženú expresiu génov asociovaných s imunitnou zložkou nádoru. Toto zároveň potvrdili experimentálne; nádory s missense mutáciou v p53 vykazujú zníženú infiltráciu lymfocytov. Autori tento jav asociovali

so zvýšenou expresiou proteínov extracelulárnej matrix, infiltráciou fibroblastov, ktorá spôsobuje desmopláziu typickú pre PDAC. Expresia TP53^{R172H} (myší analóg ľudského R175H) viedla k zvýšenej fibróze vytvorených nádorov. Zvýšená desmoplázia zároveň zabraňuje infiltrácii imunitných buniek (Maddalena et al., 2021), ale môže tiež prispievať k nižšej citlivosti nádorových buniek PDAC k liečivám.

Mutovaná forma p53 môže nadobudnúť aj novú funkciu, často výhodnú pre onkologický fenotyp bunky. Výhoda, ktorú získavajú bunky napríklad bodovou mutáciou R172H (v myšom modeli) je invazívnosť, podporuje tvorbu metastáz čo neplatí pre bunky, u ktorých je gén *TP53* deletovaný (Morton et al., 2010). Mutácia prináša teda nádorovým bunkám rastovú výhodu. Akumulácia p53 podporuje aj napádanie lymfatických uzlín a následne aj inváziu metastáz do pečene (Hingorani et al., 2005; Morton et al., 2010).

Mutovaný p53 umožňuje nezávislosť bunky na mitogénnych signáloch z okolia. Dokáže totiž indukovať expresiu receptoru PDGFR β a rovnako tak aj syntézu jeho ligandu PDGF, čím je zabezpečená autokrinná signalizácia, s ktorou nádor nadobúda zvýšenú schopnosť invazivity a formovania metastáz (Weissmueller et al., 2014). Často sú bodové mutácie v p53 spájané s horším prežívaním. Napríklad bodové mutácie p.A138V (Saha et al., 2020) a p.R248W (Humpton et al., 2018), kedy nádory exprimujúce tieto mutované formy p53, vykazujú agresívnejší fenotyp (Humpton et al., 2018; Saha et al., 2020). Ďalšie mutácie zvyšujúce expresiu, tentokrát receptoru EGFR, je mutácia p.R273H. EGFR aktivuje signalizáciu AKT vo zvýšenej miere inhibuje TS KLF6, čím podporuje formovanie sekundárnych lézií (Sun et al., 2020).

Alternácie *KRAS* a *TP53* sú v kontexte PDAC nádoru mnohokrát prepojené. Spomínaná onkogénna signalizácia K-Ras a ňou indukovaná senescencia je spôsobená práve vďaka fyziologickej funkcii p53 aktiváciou p21 (Serrano et al., 1997). Pre obchádzanie zastavenia rastu sa alternácie *TP53* často nachádza v spojení s *KRAS* mutáciou a dochádza k nej v neskorších fázach vývoja (Morton et al., 2010). Ďalším spojovníkom medzi onkogénnou signalizáciou K-Ras a mutantnými formami p53 (konkrétne p.R175H) je prostredníctvom splicing faktorov hnRNPK, ktoré sú exprimované vo zvýšenej miere prostredníctvom indukcie mutovanou formou p53 vedúcemu k zmenám v zostrovi, čím vzniká GAP proteín neukotvený do membrány. Touto zmenou je znížená miera interakcie GAP s K-Ras-GTP na membráne, a teda proteín zostáva dlhšie aktívny a vzniká už spomínaná onkogénna signalizácia (Escobar-Hoyos et al., 2020).

Okrem priamej tumor-supresívnej regulácie má p53 rolu aj v metabolizme bunky (Vousden and Ryan, 2009). Napríklad forma s mutáciou v hotspot mieste p.R248W má vplyv pri hladovaní na glycín (Tran et al., 2017) a serín (Humpton et al., 2018). Mutované formy p53 tiež spôsobujú alternácie v metabolizme glukózy a glutamínu (Morris et al., 2019). Alternáciami v metabolizme vzniká agresívnejší fenotyp nádorov (Humpton et al., 2018; Morris et al., 2019). Bola pozorovaná aj závislosť na mevalonátovej dráhe u buniek s mutovanou formou p53 (Oni et al., 2020).

2.2.4 SMAD4

Ďalší frekventovane mutovaným TS génom v PDAC je *SMAD4* (z angl. „SMAD4 family member 4“), ktorý kóduje proteín Smad4. Ten zohráva úlohu v 3 dráhach a to: TGF β , Wnt a FGF/EGF. Pre nádorovú biológiu je z menovaných dráh najvýznamnejšia dráha TGF β . Tou je Smad4 aktivovaný a následne presunutý do jadra, kde funguje ako TF (Yingling et al., 1997) regulujúci viaceré bunkové procesy. Tieto procesy sú významné v rakovinových bunkách pre proliferáciu, diferenciáciu, migráciu, invazivitu a remodeláciu medzibunkovej hmoty. Signalizácia dráhou TGF β , podobne ako p53, indukuje expresiu p21 proteínu čo vedie k zástave bunkového cyklu v G1 fázy (Grau et al., 1997) prípadne až k apoptóze (Tascilar et al., 2001).

U PDAC nádorov dochádza u viac ako polovice tumorov k homozygotnej delícii tohto lokusu (Aguirre, 2003). Ďalšími alternáciami sú bodové mutácie, z ktorých je častá substitučná mutácia a nonsense mutácie vedúce k tvorbe skráteného proteínu (<https://bit.ly/2VmqlR>).

Pokusy s geneticky modifikovanými myšmi modelmi v práci (Bardeesy et al., 2006) ukázali, že v prípade súčasnej expresie KRAS^{G12D} a deletovania *SMAD4*, je onkogenézia zrýchlená (oproti samotnej expresii KRAS^{G12D}). S takýmto genetickým pozadím vzniká lézia IPMN (Bardeesy et al., 2006).

TGF β kaskáda má v onkologickom ohľade duálnu funkciu a jej výsledný efekt závisí na bunkovom kontexte. Onkogénna strana intaktnej signalizácie je významná pre nádorovú strómu, najmä v počiatočných fázach vzniku neoplázie. Dochádza k prestavbe extracelulárnej matrix, zvýšenej prítomnosti nádor podporujúcich leukocytov, regulačných T-lymfocytov a inhibícii lymfocytov cieľiacich na nádor (Principe et al., 2016; Tascilar et al., 2001). Taktiež podporuje ADM indukovanú onkogénnou mutáciou K-Ras, čo vysvetľuje inhibíciu dráhy až v neskorších fázach tumorogénie (Chuin et al., 2017; Liu et al., 2016; Wilentz et al., 2000).

Avšak funkčný Smad4 predstavuje bariéru úniku nádoru imunitnému systému organizmu (Ischenko et al., 2021).

Na druhú stranu stratou expsie *SMAD4* lézia nadobúda agresívnejšiu povahu nádoru. Pacienti u ktorých je Smad4 funkčný vykazujú po resekcii lepší priebeh ako tí s inaktivovanou funkciou Smad4 proteínu (Blackford et al., 2009; Tascilar et al., 2001).

Signalizácia TGF β /Smad4 sa prejavuje rôzne aj v závislosti na diferenciácii bunky. U nediferencovaných línií prítomnosť kaskády viedla k zvýšenej proliferácii a migrácii. Na druhej strane u diferencovaných línií znamenala bunecnú smrť. Takže bunky, ktoré stratia Smad4 rastú rýchlejšie, obchádzajú blokovanie progresie onkogénnej formy K-Ras^{G12D} a senescenciu, ale zostávajú diferencované ako epitelové bunky (Bardeesy et al., 2006). Smad4 prináša výhody aj pri pohyblivosti buniek, EMT a metastázach. Bunky exprimujúce Smad4 proliferujú rýchlejšie, ale zostávajú v diferencovanej histológii duktálneho charakteru, na rozdiel od stavu, keď sa proteín v bunke nenachádza (Bardeesy et al., 2006).

Neopomenuteľné sú aj bodové mutácie tvoriace pozmenené proteíny ako napríklad alternácia p.Y353C. Táto oblasť sa nachádza v MH2 doméne (sprostredkováva interakcie s partnermi alebo sebou samým s MH1 doménou) a v porovnaní s wt formou prináša bunkám schopnosť zvýšenej migrácie znížením expsie E-kadherínu a naopak zvýšenie vimentínu (v prípadoch bez Smad4 oproti wt) (Wang et al., 2019). Mutácie v MH2 doméne sú spájané so zhoršenou prognózou (Singh et al., 2012).

Zaujímavosťou je aj vplyv delécie *SMAD4* na ostatné gény situované v genóme blízko seba. Na chromozóme je asi 200 bp od *SMAD4* vzdialený gén pre oxidatívnu dekarboxylázu „malic enzyme 2“ (ME2), ktorá sa účastní katalýzy malátu na pyruvát a tým udržuje NADPH a ROS homeostázu. V PDAC býva často tento úsek DNA deletovaný súčasne so *SMAD4*. Túto skutočnosť je možné využívať ako cieľ terapie (Dey et al., 2017), pretože delécia ME2 aktivuje alternatívny mitochondriálny enzým, ME3, ktorý sa v týchto malignitách dá potom zacieliť terapeuticky.

2.2.5 CDKN2A

Gén *CDKN2A* (z angl. „cyclin dependent kinase inhibitor 2A“), patrí k trom najčastejšie inaktivovaným TS génom v PDAC. Prepisom tohto génu sa alternatívnym splicingom vytvárajú proteíny p16^{INK4A} a p14^{ARF} (Ouelle et al., 1995). Funkcia oboch proteínov je protinádorová, avšak fungujú v odlišných dráhach. Dráha proteínu p16^{INK4A} kontroluje prechod z G1 do S fáze

BC. Túto rolu zastáva interakciou s ďalším TS pRB (retinoblastomový proteín), čím reguluje bunecnú proliferáciu inhibíciou cyklín dependetných kináz 4 a 6 (McConnell et al., 1999). Tieto kinázy hyperfosforylujú pRB pre pokračovanie BC (Serrano et al., 1993; Shay et al., 1994). Funkcia p14^{ARF} spočíva v kontrolovaní dráhy iného TS, a to p53. Vyvážovaním inhibítora MDM2 p14^{ARF} určuje stabilitu p53, ktorý môže vykonávať svoju fyziologickú funkciu, najmä v indukovaní apoptózy (Sharpless and Chin, 2003). V nádorovom kontexte má neopomenuteľnú úlohu v indukcii senescencie (Shay et al., 1991).

V PDAC dochádza najčastejšie k delícii génu (<https://bit.ly/2VmquIR>) alebo k hypermetylácii promótoru, dôsledkom čoho proteín nie je produkovaný (Attri et al., 2005; Tang et al., 2015). Ďalej sú časte mutácie, z ktorých sú najčastejšie nonsense (<https://www.mycancergenome.org/content/gene/cdkn2a/>). Inaktivácia tohto TS je dôležitá pre vyhnutie sa senescencii (Serrano et al., 1997).

Zmeny v *CDKN2A* sú spojené so zvýšeným rizikom PDAC, zhoršenou prognózou pacientov (Doyle et al., 2019; Tang et al., 2015), metastázami v lymfatických uzlinách a vyšším štádiom ochorenia (Hosoda et al., 2017; Jeong et al., 2005). Taktiež ale sledujeme tvrdenie, že k alternáciám dochádza náhodne v progresii ochorenia v rôznych štádiách (Hustinx et al., 2005). V súvislosti s mutáciou v tomto géne existuje riziko rozvinutia dedičnej formy PDAC (Ibrahim et al., 2018).

Podobne ako pri *SMAD4*, pri frekventovanej homozygotnej delícii génu *CDKN2A* môže dochádzať k stratám aj časti chromozómu z jeho blízkej oblasti. V nej sa nachádza *MTAP* gén, ktorý kóduje proteín dráhy polyamínového metabolizmu. V mnohých prípadoch bývajú oba gény deletované súčasne (Hustinx et al., 2005; Wilentz et al., 1998).

2.3 Kachexia

Na závažnosti nádorových ochorení sa podieľa aj frekventovane sa vyskytujúci úbytok hmotnosti pacientov. Táto dysfunkcia je označovaná ako kachexia a postihuje asi 50 % onkologických pacientov, najmä pri nádoroch tráviaceho traktu, pankreasu, pľúc a kolorekta (Dewys et al., 1980). Kachexia predstavuje systémové ochorenie organizmu, vplýva na celkový fyzický stav pacientov, komplikuje samotný priebeh ochorenia a liečby a vedie k systémovej zápalovej odpovedi. Definovaná je stratou hmotnosti o viac ako 5%, BMI nižším ako 20 alebo stratou svalovej hmoty a stratou hmotnosti o viac ako 2% (Fearon et al., 2011). V štúdiách však môžu byť používané rozdielne kritériá.

Prítomnosť kachexie nekoreluje s veľkosťou tumoru, jeho stupňom, predoperačným stavom, resekciou, BMI (Bachmann et al., 2008; Hendifar et al., 2018), či rozšírením do lymfatických uzlín (Bachmann et al., 2013). Je prítomná u 63 % diagnostikovaných pacientov s PDAC (so stratou hmotnosti viac ako 5 %) (Hendifar et al., 2018). Častejšie je prítomná u pacientov s pokročilým štádiom ochorenia s prítomnými metastázami, čo môže spájať dediferenciáciu nádorových buniek s rozvojom kachexie (Bachmann et al., 2008). Pri kachexii pacienti postupne strácajú tukovú a následne aj svalovú hmotu (Das et al., 2011) ako dôsledok zmien v metabolizme lipidov (Agustsson et al., 2012; Bachmann et al., 2009) (zvýšená lipolýza (Danai et al., 2018; Das et al., 2011)) a proteínov (zvýšená autofágia a degradácia proteínov v proteazóme (Danai et al., 2018), alebo naopak znížená syntéza proteínov (Van Royen et al., 2000)). Poškodené svalové tkanivo je nahradzované tukovým a fibrotickým, ktoré majú rozdielne vlastnosti od pôvodného (Judge et al., 2018). Nebezpečné je najmä zníženie aktivity svalov zabezpečujúcich dýchanie (Bachmann et al., 2009) a znižovanie srdcového svalu (Das et al., 2011). Dôsledkom zmien v tráviacom trakte dochádza k fyzickým zmenám organizmu a to k anorexii, malonutricii a stratám chuti k jedlu (Bachmann et al., 2013, 2009).

Myšie modeli nádorom indukovanej kachexie odhalili, že stratám tukového a svalového tkaniva je možné zabrániť, alebo minimálne ich zmierniť, odstránením génov lipáz Atgl a Hsl. Tieto lipázy sa zúčastňujú katabolizmu tukov uložených v tukových kvapôčkach. Deléciou génu pre Atgl, a do menšej miery delécia génu pre Hsl, zabraňuje kachexii (Das et al., 2011). Ďalším novým progresom v porozumení systémových zmien pri nádorových ochoreniach je spojenie proteínu lipocalín 2 s kachexiou. Počas progresie PDAC dochádza k zvýšeniu expresie tohto proteínu, čo má za následok zníženie apetítu a má význam v anorexii prítomnej počas kachexie a tiež vedie k stratám tuku a čistej svalovej hmoty (Olson et al., 2021).

U myších modelov sa vyskytuje kachexia iba ak rakovinové bunky tvoria nádor výhradne v pankrease. Tkanivo pankreasu je nádorom poškodzované a nezastáva svoju fyziologickú funkciu, exokrinná žľaza je menej účinná. U myších modelov bol taktiež pozorovaný súvis zníženej exokrinnej funkcie pankreasu a straty v tukových tkanivách a úbytok periférneho svalstva (Danai et al., 2018).

Zhoršené prežívanie pacientov s PDAC tiež koreluje so zvýšeným výskytom cytokínov v sére, a to CRP, IL-6, MIC-1 a TNF-RII, z ktorých je v kontexte kachexie najvýznamnejší IL-6 (Babic et al., 2018). Signalizácia tohto cytokínu prebieha cez interleukín receptor 6, čím sú

aktivované ďalšie dráhy, z ktorých je pri kachexii významná JAK-STAT3 dráha (Bonetto et al., 2012, 2011). Zvýšený výskyt TF STAT3 v jadre mení hladiny transkripcie proteínov vo svaloch, čo podporuje proteolýzu a zvýšenie expresie proteínov akútnej fáze (Bonetto et al., 2011).

Kachexia môže byť považovaná za prognostický faktor, keďže pacienti ňou trpiaci vykazujú zhoršenú prognózu ochorenia, v porovnaní s PDAC pacientami u ktorých nedochádza k významným stratám hmotnosti (o viac ako 5%) (Bachmann et al., 2013, 2008; Hendifar et al., 2018). Potvrďuje to aj zlepšenie prognózy pacientov po stabilizácii ich váhy (Bachmann et al., 2013, 2008; Davidson et al., 2004).

Významný problém predstavuje aj pri podávaní liečby pacientom. Pacientom je na základe „body-surface-area“ vypočítaná dávka liečiva. Tento výpočet však neberie do úvahy svalovú hmotu a zadrživanú vodu v organizme. Výrazné chudnutie pacientov však predstavuje problém, keďže pre chudšieho človeka môže mať pôvodne určená dávka toxický efekt. Z toho dôvodu je nevyhnutné kontrolovať váhu pacientov (Barret et al., 2014; Mitsunaga et al., 2020; Prado et al., 2007).

2.4 3D in vitro modely

2D kultivačné metódy sú využívané pre ich jednoduchosť oproti 3D kultivačným metódam. 3D kultúry však lepšie vypovedajú o fungovaní nádorovej masy tak, ako je tomu v pacientovi (Donglai et al., 2016) a sú historicky využívané preto, lebo sú schopné zachovávať morfológiu a bunkové typy podobné tkanivu, z ktorého sú odvodené (Elyada et al., 2019). Taktiež sú schopné efektívne tvoriť nádory v myších modeloch (Boj et al., 2015). Organoidové kultúry odvodené z PDAC sú pomerne dobre optimalizované, a využívajú najmä WNT3a-kondicionované médium, ktoré zaisťuje možnosť dlhodobého udržania kultúry (Seino et al., 2018; Tiriac et al., 2018). Kultúry organoidov PDAC sa často využívajú na genetické a transkriptomické profilovanie nádorov a v budúcnosti sa hovorí o možnostiach ich využitia pre určovanie senzitivity k chemoterapii s cieľom zlepšiť individualizáciu liečebných postupov (Tiriac et al., 2018).

3 Cieľ práce

Cieľom práce bolo zistiť prítomnosť mutácií vo vzorkách primárnych nádorov. Poznatky tejto diplomovej práce a zavedený protokol má byť následne využitý pre potreby projektu „Nádor pankreatu: metabolické zmeny asociované s inzulínovou rezistenciou“. Konkrétne bude genetické pozadie použité pri stratifikácii metabolomických profilov daných organoidov.

Jednotlivé ciele:

Analýza potenciálnych alternácií z genomických databáz

Optimalizácia metódy izolácie DNA, PCR a sekvenovania Sangerovou metódou

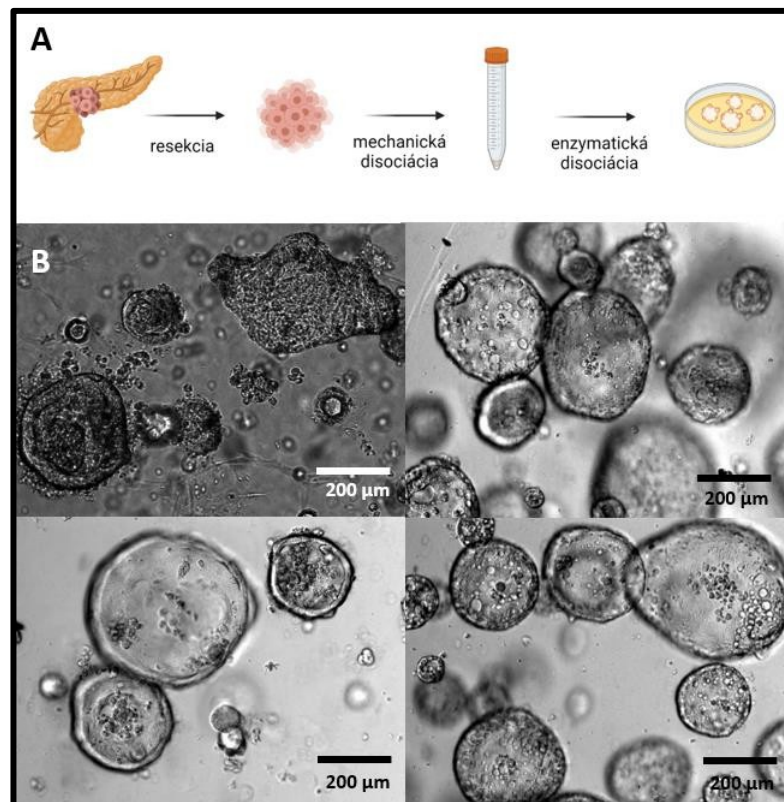
Detekcia mutácií génov *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4* v organoidoch odvodených z PDAC pomocou sekvenovania Sangerovou metódou a PCR a ich vyhodnotenie

Vyhodnotenie expresných profilov proteínov K-Ras, p53, p16 a Smad4

4 Materiál a metódy

4.1 Materiál

Izolácia a príprava kultúr organoidov z resekovaných nádorov PDAC nebola súčasťou tejto diplomovej práce, preto je postup popísaný iba skratkovite. Po resekcii nádoru bola na patológii oddelená časť nádoru a skladovaná v médiu DMEM/F12 a transportovaná na ľade do FGÚ AVČR. Nádor bol zvážený, niekoľkokrát rozstrihaný a premytý roztokom HBSS s pridaným gentamicínom, ďalej natrávený pomocou DH liberázy (Roche, Merck) a TrypLE (Gibco) 1-2 hodiny. Uvoľnené organoidy boli oddelené od zvyšného tkaniva pomocou 200 µm sitka a premyté HBSS. Organoidy boli potom pestované v matrigeli BME (Cultrex Reduced Growth Factor BME, Type 2 PathClear) podľa protokolu popísaného v práci (Seino et al., 2018). Pri kultivácii boli postupne odoberané vzorky na biochemické a genetické analýzy a skladované v -80 °C. Schematické znázornenie prípravy kultúry organoidov a ich názorné zobrazenie je v **obrázku č. 7**.



Obrázok č. 7: Schematické zobrazenie prípravy vzorku pre pestovanie *ex-vivo* v 3D kultúrach organoidov. Vytvorené s BioRender.com (A). Fotografie pestovaných organoidov (B).

4.2 Súbor pacientov

Vzorky resekovaných nádorov boli získané v rámci projektu s názvom „Nádor pankreatu: metabolické zmeny asociované s inzulínovou rezistenciou“ vo Fakultnej nemocnici Královské Vinohrady v Prahe. Do štúdie boli zaradení pacienti s diagnózou PDAC (štádium 0-IIb), indikovaní k resekcii nádoru, ktorí mali alebo nemali nádorovú kachexiu. Odber preoperatívnych vzoriek pre potreby pestovania primárnych organoidov bol schválený etickou komisiou FNKV.

4.3 Izolácia DNA z bunkových línií a z *ex-vivo* pestovaných kultúr

K pelete organoidov/buniek bez média, skladovanej pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1,5 ml skúmavke bolo pridaných 300 μl Cell lysis Solution a 1,5 μl roztoku proteínázy K z kitu Animal and fungi DNA Preparation kit-solution-based, (kat. č. PP-208S, Jena Bioscience, Nemecko), inkubované pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, až kým nebol materiál úplne rozpustený (u bunkových línií približne 1 hodina, u organoidov asi 3 hodiny). Vzorky boli ďalej spracované podľa protokolu výrobcu nasledovne: k vyzrážaniu proteínov bol lyzát miešaný s 100 μl Protein Precipitation Solution na vortexe po dobu 20 sekúnd a následne centrifugovaný ($15\ 000\times g$, 3 min). V prípade ak peleta zrazených proteínov nebola pevná, proces bol zopakovaný s medzi krokom, ktorý pozostával z inkubácie zmesi 10 min na ľade až potom bola zmes vložená do centrifugy. Následne bol supernatant odobraný do 1,5 ml skúmavky a pre vyzrážanie DNA k nemu bol pridaný $>99\%$ izopropanol, 50 \times bola skúmavka prevrátená pre dostatočné a šetrné zamiešanie a centrifugovaná ($15\ 000\times g$, 1 min). Supernatant bol odstránený a peleta s DNA bola opláchnutá 500 μl premývacím pufrom, zmes bola premiešaná opakovaným prevrátením skúmavky a centrifugovaná ($15\ 000\times g$, 1 min). Peleta s DNA bola sušená 15 min pri RT. DNA bola rozpustená v 50 μl DNA hydratačného roztoku a k nemu bolo pridaných 1,5 μl RNázy A, zmes bola premiešaná opakovaným otáčaním skúmavky. Pre odstránenie RNA vzorka bola inkubovaná pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min, po ich uplynutí bola teplota zvýšená na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ pre hydratovanie DNA. Následne bola zmeraná celková koncentrácia a skontrolovaná kvalita izolovanej DNA prístrojom NanoDrop (NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific). DNA bola rozdelená na alikvoty a skladovaná pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zriedená pracovná alikvota o koncentrácii 10 ng DNA/ μl bola skladovaná pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 *In silico* analýza

S využitím databáz TCGA (www.cancer.gov), cBioPortal (www.cbioportal.org), COSMIC (cancer.sanger.ac.uk/cosmic) a dostupnej literatúry boli vyhľadávané najčastejšie mutované gény v PDAC nádoroch a následne hľadané najčastejšie spôsoby alternácií a dohľadané hotspot miesta v týchto génoch (presný postup jednotlivých analýz pozri kapitola Výsledky). Zistené alternácie v génoch nášho záujmu vyskytujúcich sa v použitých bunkových líniách z databáze cBioPortal (**tabuľka č. 7**) boli využité pre zavedenie a optimalizáciu metód.

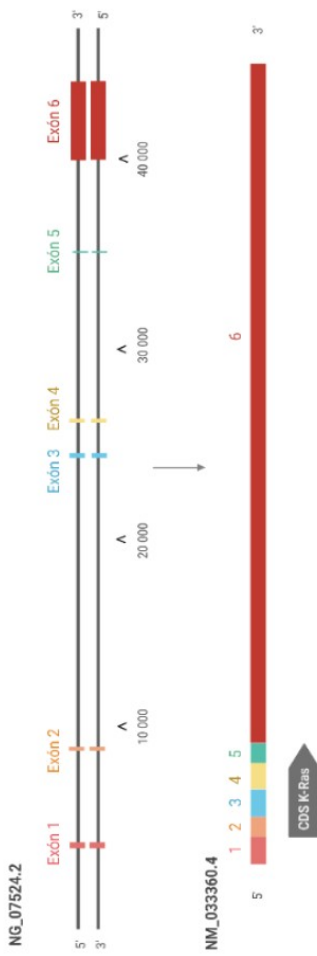
4.5 Návrh primerov pre PCR a sekvenáciu

Pre vybrané úseky genómu boli navrhnuté primery za pomoci nástroja pre tvorbu primerov Primer3 (Untergasser et al., 2012) na portáli NCBI. Primery boli zvolené tak, aby čo najlepšie vyhovovali nasledovným požiadavkám: 1) veľkosť 18-25 nukleotidov, 2) obsah GC párov 40 až 60%, s výhodou na 3' konci G, C báze, 3) teplota topenia (T_m) oboch primérov páru je zhodná, prípadný rozdiel je 1-2 °C, T_m sa pohybuje ± 5 °C okolo 58 °C, 4) jednotlivé oligonukleotidy netvorí sekundárne štruktúry pri teplote, v ktorej sa zmes ocitá pri priebehu reakcie a oligonukleotidy sú taktiež bez opakovaní báz za sebou, 5) nesmú vznikáť vzájomné diméry párov, 6) oligonukleotid špecificky nasadá na určený úsek genómu.

Amplifikovaná oblasť bola zvolená s obojstranným presahom sekvencie o viac ako 50 bp (base pair) pre zaistenie čitateľnosti sekvenogramu v oblasti záujmu. Ako referenčné sekvencie boli využívané sekvencie z portálu NCBI a to sekvencie s referenčným číslom NCBI: NG_007524.2, NM_033360.4 (*KRAS*), NG_017013.2, NM_000546.6 (*TP53*), NG_013013.2, NM_005359.6 (*SMAD4*) a NG_007485.1, NM_000077.5, NM_058195.4 (*CDKN2A*). Sekvencie boli prenesené do prostredia programu SnapGene, kde v nich boli vyhľadované hotspot miesta a označené nasadacie miesta primerov. Vybrané miesta spolu s hotspot miestami a primermi sú zobrazené v **obrázkoch č. 8-11**.

V **tabuľke č. 1** sú zobrazené jednotlivé primery, ich sekvencia, nasadacia teplota a veľkosť výsledného produktu. Primery boli použité rovnako v PCR aj v sekvenačných reakciách (vždy „forward“ primer z páru). Primery boli objednané z Metabion International AG.

A



B

KRAS_EX1_F
 aaaggactgtggatttgatg
 5'-gtttaaaggctggtggatttgatgattaaacctatgtgacgtctcctaatagcaccatttcattttattatgaagcctctgaaatgactgaataaaacctgtgagctgtggcgttagcaagaatgacct
 3'-cataatttccatgaccctcctaaactatcacataatggaaacacnctgacaagattatcaggtcaaaagtaataaaataatctcggacgttttactgacttatttgacaccatcaacctgaccaccgcatcctctccagga

KRAS EXON 2

p.G12A/C/D/R/S/V
 p.G13C/D

tgcatcacgctaatccagaatcatttggacgaatgatccacaatagagtaaacctgttttataatgcatattctctggcagaccattcttctgacacataaagttctctgacattctcatcacaagaataatta 3'
 5'-tggccatttgcctcatcttggacagaaacaatgtcttcaagtccttggccatttttaatttgaattttgtgtgagttgtataaaccttttgaagtaaaagtgccctgtaataatccagactgtttctccctctccaggat
 3'-accgtaaacagcagctagaaacctcctctttacagaaaagttcagaaaacgggttaaaatttaacttataaaacaacactcaacataatgtggaataaactctatttcccaagagctgttaaaagctcatgataaagttcttaata 5'

KRAS EXON 2

cgctccggtaagaacaactatgctc

KRAS_EX2_R

C

tctcagaagaagaagtagtaattgatggagaacctgtcctctggataatctcgacacagcagcgaaggagtcacagtgcaatgaggaccagctacatgagcctgggggggtttctttgtgatttgcataaatacctaattcttgaag
 5'-tggccatttgcctcatcttggacagaaacaatgtcttcaagtccttggccatttttaatttgaattttgtgtgagttgtataaaccttttgaagtaaaagtgccctgtaataatccagactgtttctccctctccaggat
 3'-accgtaaacagcagctagaaacctcctctttacagaaaagttcagaaaacgggttaaaatttaacttataaaacaacactcaacataatgtggaataaactctatttcccaagagctgttaaaagctcatgataaagttcttaata 5'

KRAS EXON 3

cgctccggtaagaacaactatgctc

KRAS_EX3_F

cgctccggtaagaacaactatgctc

KRAS_EX3_R

atattcacattatagggtgggttaaaattgaataaagaatgacattaaaggatattatgtttttttttttggcttctgctaatgccaatgataatatttaataaaatttttaaatatgtttttaggtaggtaatacctcttttata 3'
 5'-tggccatttgcctcatcttggacagaaacaatgtcttcaagtccttggccatttttaatttgaattttgtgtgagttgtataaaccttttgaagtaaaagtgccctgtaataatccagactgtttctccctctccaggat
 3'-accgtaaacagcagctagaaacctcctctttacagaaaagttcagaaaacgggttaaaatttaacttataaaacaacactcaacataatgtggaataaactctatttcccaagagctgttaaaagctcatgataaagttcttaata 5'

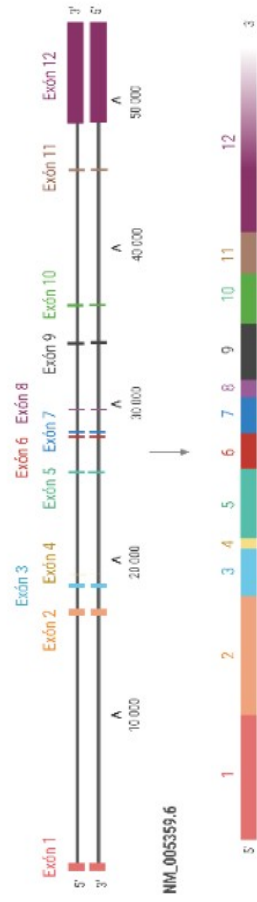
KRAS EXON 3

cagaacgattacgggtactgt

KRAS_EX3_R

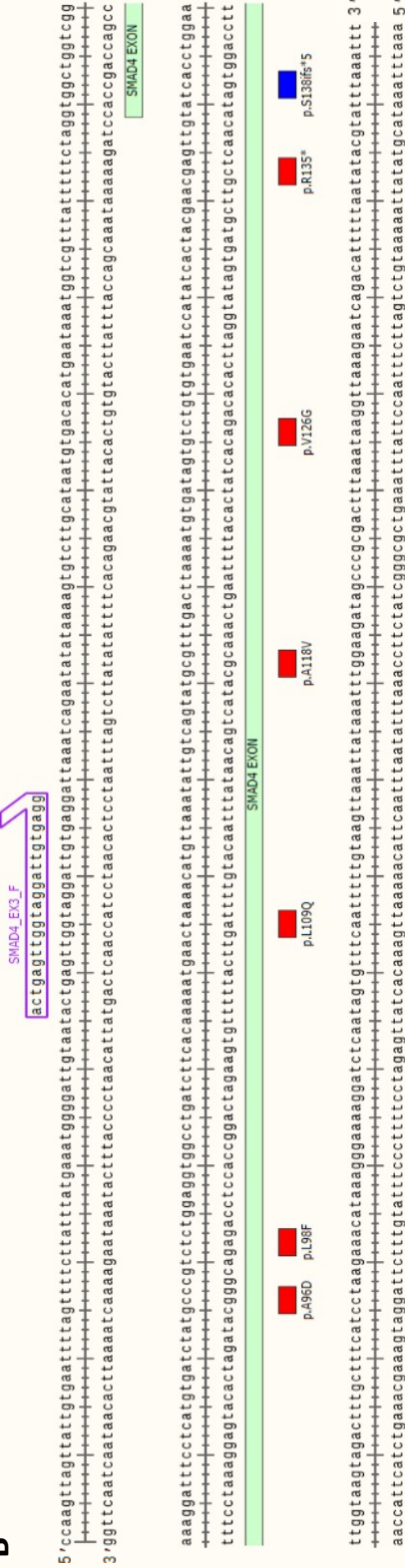
Obrázok č. 8: KRAS
 zobrazenie génu, exónov a mRNA spolu s kódujúcou oblasťou. Vytvorené s BioRender.com (A). Grafické znázornenie vybraných exónov spolu s použitými primermi a hotspot miestami, pre exón 2 oblasť 5 441-5 759 bp (B), exón 3 oblasť 23 361-23 840 bp (C), génu KRAS. Vytvorené v SnapGene.

A NG_013013.2



NM_005359.6

B



SMAD4 EXON

cttctatcggggcgtgaaa
SMAD4_EK3_R

C

```

5'cctacaccttaatgcaatactgattatattatcagtggtttggggtcattacattccatcccccttaccctttttagaaaaactggttggaggtcaagtgaaagccttattcttcctcatgggagagtggtttccccattta
3'aggatggaaaaatcagtaatacaataaaatcaggtcaaaaaccacgttaagtaaggtgaggggaggaatgggaaagaaaacttttgcacaacaccctcagctcactttcggaaatagaaaagaccctctacaagaaaggtaaat
ttccctagctctcctgaggttccatgcttacttgaatggatggtcaggtagggagacattaaagttccctcaagctgaccttattgtaggtacagcctctggagagatcgtttgtttgggtcaactctcca
aaaaggatcggaggactataaccacaaggtaacgaatgaaactttaccataagtcctctctgtaaatccaaaggaggttcgacaggatacaaaatgacaactaccatgacctgggaagaccctctctagcgaaaaaaacccagttgagaggt

```

SMAD4 EX9_F
ctgtgttggagtgcaagtg

SMAD4 EX9
p.P342Lfs*42 p.D351A p.P356L p.Q366*
p.G352*/v p.D355G p.R361G/G/H p.G358_D360del

SMAD4 EXON 9

atgtccacagacagaagccattgagagagcaaggtatgtatagtcagatgttactttaaanaattggacatagtcattgttttcccaagtattgtttcccaatgataatgataaataaataaagaaggatca
facaggtctcgttcctggtaactctcgttccataactaacatacagtcatacgaatgaaatttttaactcgtatcatgaacagaaaataagttccaaatacaaaaggtcacgttaataacacagaatttatatttccctatttccagtt
5'tgtgaaaactcagaattgtcaagcactccatcctaattgctggttttttggtttaacataataagataaaagatagccttttctatgttaggtttctctgtaagttaagccttttgaatccagtttgaatatttatttc 3'
acaacttttgagttctaaacattcgtgaggtagaattaacagccacaanaaacaaaattgtatattttctatcggaaaaatacaatcccaagatacaaaacttaccatgaaaacttcaagcctttaaataaagaag 5'
gcgaggtagaattaacagcca

SMAD4_EX9_LR

D

```

5'gaaatgaaagtcccttaaccaaaagtgcagcttgatgataaagttagatactactgttactcttggcaatttagcagaagaattatgctcgagagaaatgaaatcacagaaagcggctcacttgaattttagaattagagagatggaga
3,ctttacattcaaggaattggtttcacagctcgaaacatttcaaatctagatgacaatgaaacgtgaaatcgtctctcaatagcactcttactttatgctttcgaccaggaactaaatcttaactcctctacccctt
gataccctgcccctgatactccaaacttttcgttaggtcgtcagctgctgcgaaattgggttgatgaccctgctcgtatgatactcagatgatttgaaaaggctgggaccggtatccccaagacagacataaaagaacac
ctagtgggacagagactacagaagtttagaaaagacaatccagacagctcgacagcacttaaccacactactggaagcagaatacgtatgagctcaactcaaaaacttccgcccctggccttggcctgctcgtatgattctttg

```

SMAD4_EX12_F
gaaatcacagaaagcggctcacttg

SMAD4 EXON 12

cttctggaattgaaattcacttacacgggcccctccagctccctagacaagacttcataccatgccgattgcagaccacaacctttacccttggggccccttaacccttaccaggtggggagatacaaaaaatacaatccctgttta
gaaagcccaacttaagtgaattggtgcccggaggctcgagatctcctcaggaatcggtagcgtaactaacgcttaacgcttggaactgcagcctcaaaaatggacccagaataatggaaatagctccaccacacctgattttatgttaggacaat
p.P522Lfs*4 p.L536P p.D537H p.R498H p.K507RIS*19 p.W509*/G p.L513* p.S517HIS*9 p.E520* p.S522Lfs*4

SMAD4 EXON 12

```

taatctgaaataatttccatttctgtctttatcttcaaaagggttgaaaatggttggctgctccctcagacagacaactggatataaacaatttttttccccctcagaaacttgcaggatgctcagagcttgaagattagg 3'  

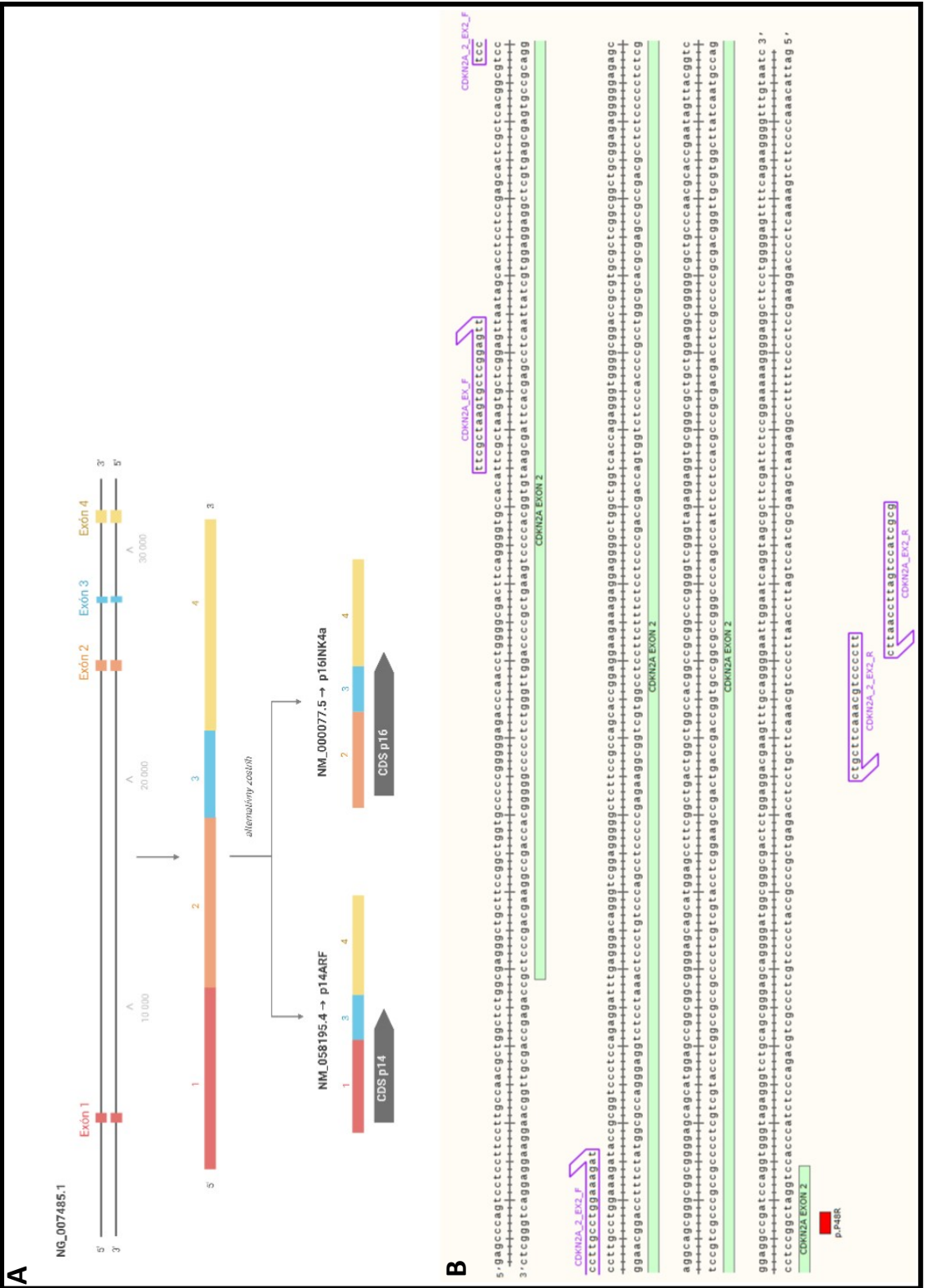
attagactctataaaatgaaaacaagacgaaaatgaaaagatttcccaactttcacaaacagcggaacggagatcgtcgtcttgaaacttgcaccccaacttctgaaacagctccagctccgaacttcaatcc 5'  

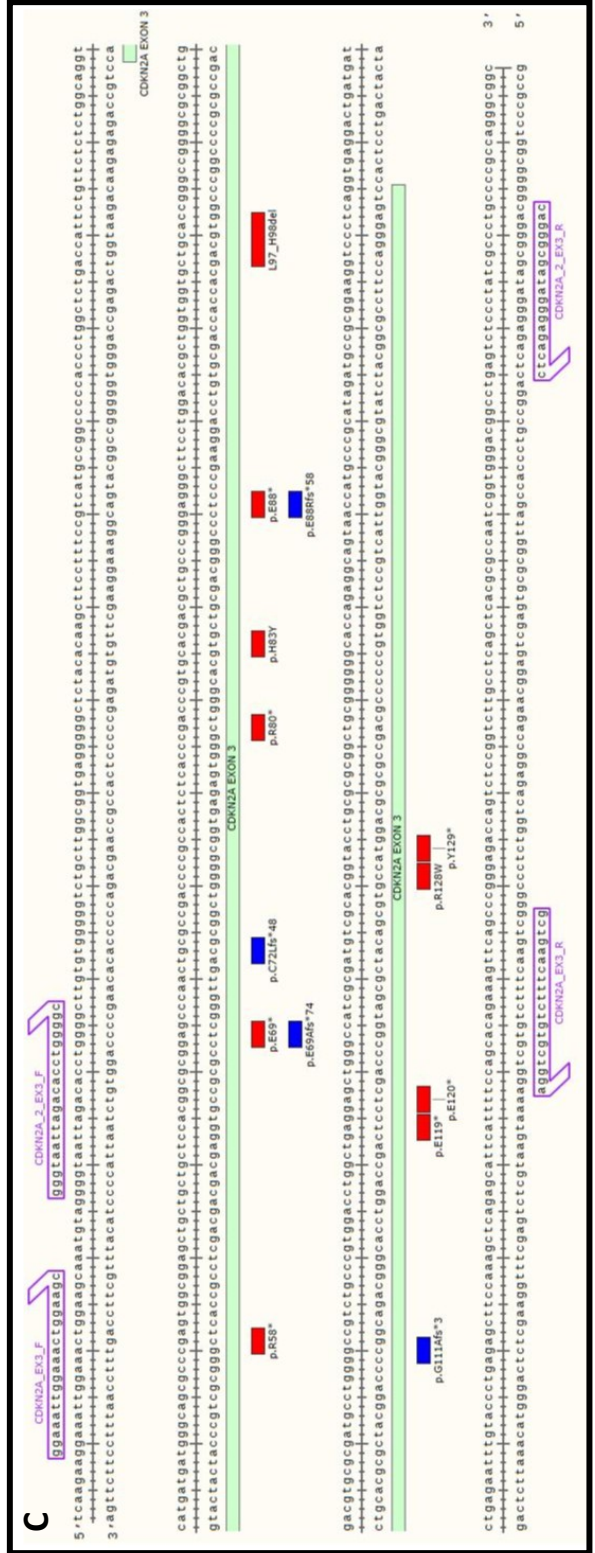
faaacgacggagacgaggat

```

SMAD4_EX12_R

Obrázok č. 10:
SMAD4
 zobrazenie génu, exónov a mRNA spolu s kódujúcou oblasťou.
 Vytvorené s BioRender.com
(A). Znázornenie vybraných exónov spolu s primermy a hotspot miestami, pre exón 3, oblasť 18 326-18 805 bp **(B)**, exón 9, oblasť 35 041-35 680 bp **(C)** a exón 12, oblasť 47 841-48 480 bp **(D)**, génu **SMAD4**.
 Vytvorené v SnapGene





Obrázok č. 11:
CDKN2A Zobrazenie génu, exónov a mRNA spolu s kódujúcimi oblasťami. Vytvorené s BioRender.com **(A)**. Grafické znázornenie vybraných exónov spolu s primermy a hotspot miestami, pre exón 2 oblasť 24 322-24 959 bp **(B)**, exón 3 oblasť 28 126-28 763 bp **(C)**, génu **CDKN2A**. Vytvorené v SnapGene.

Gén	exón	smer	názov	sekvencia	veľkosť produktu	nasadacia teplota
KRAS	EXÓN 2	Forward	KRAS_EX2_F	5'-AAAGGTAAGTGGTGGAGTATTTGATAGT-3'	264 bp	58 °C
		Reverse	KRAS_EX2_R	5'-CTGTATCAAAGAATGGTCTGC-3'		
	EXÓN 3	Forward	KRAS_EX3_F	5'-ACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG-3'	282 bp	60 °C
		Reverse	KRAS_EX3_R	5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3'		
TP53	EXÓN 5+6	Forward	TP53_EX5+6_F	5'-GTTTCTTTGCTGCCGTCTTC-3'	515 bp	62 °C
		Reverse	TP53_EX5+6_R	5'-CACTGACAACCACCTTAACC-3'		
	EXÓN 7	Forward	TP53_EX7_F	5'-GCACTGGCCTCATCTTGG-3'	212 bp	60 °C
		Reverse	TP53_EX7_R	5'-GGGTCAGAGGCAAGCAGA-3'		
	EXÓN 8	Forward	TP53_EX8_F	5'-TCTGGCTTTGGGACCTCTTA-3'	400 bp	58 °C
		Reverse	TP53_EX8_R	5'-GGAAAGAGGCAAGGAAAGGT-3'		
SMAD4	EXÓN 3	Forward	SMAD4_EX3_F	5'-ACTGAGTTGGTAGGATTGTGAGG-3'	376 bp	58 °C
		Reverse	SMAD4_EX3_R	5'-AAAGTCGCGGGCTATCTTC-3'		
	EXÓN 9	Forward	SMAD4_EX9_F	5'-CTGTGTTGTGGAGTGCAAGTG-3'	431 bp	60 °C
		Reverse	SMAD4_EX9_R	5'-CACCGACAATTAAGATGGAGTG-3'		
	EXÓN 12	Forward	SMAD4_EX12_F	5'-GAAATACAGAAAGCTGGTCACTTG-3'	455 bp	58 °C
		Reverse	SMAD4_EX12_R	5'-TAGGAGCAAGGCAGCAAAC-3'		
CDKN2A	EXÓN 2	Forward	CDKN2A_EX2_F	5'-TTCGCTAAGTGCTCGGAGTT-3'	476 bp	X
		Reverse	CDKN2A_EX2_R	5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-3'		
	EXÓN 3	Forward	CDKN2A_EX3_F	5'-GGAAATTGGAAACTGGAAGC-3'	539 bp	X
		Reverse	CDKN2A_EX3_R	5'-GCTGAACCTTCTGTGCTGGA-3'		
CDKN2A_2.0	EXÓN 2	Forward	CDKN2A_2_EX2_F	5'-TCCCCTTGCTGGAAAGAT-3'	406bp	X
		Reverse	CDKN2A_2_EX2_R	5'-TTCCCCTGCAAACCTCGTC-3'		
	EXÓN 3	Forward	CDKN2A_2_EX3_F	5'-GGGTAATTAGACACCTGGGGC-3'	587 bp	X
		Reverse	CDKN2A_2_EX3_R	5'-CAGGGCGATAGGGGAGACTCA-3'		

Tabuľka č. 1: Použité primery. Nasadacia teplota využívaná pri DNA polymeráze Tws, Pfu a Phusion.

4.6 PCR

Pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) boli využívané DNA polymerázy, ktoré podľa výrobcu vykazujú vysokú presnosť prepisu: Tws (TopBio), Pfu DNA polymerase, recombinant (kat. č. EP0501, Thermo Scientific), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (kat. č. F530S, ThermoFisher Scientific) a Phusion Plus DNA Polymerase (kat. č. F630S, ThermoFisher Scientific). V **tabuľke č. 2** je zobrazený použitý protokol a **tabuľka č. 3** zobrazuje zložky PCR reakcie.

Príprava reakcií prebiehala v oddelenej miestnosti v PCR flow boxe. Reagencie boli pred použitím krátko premiešané na vortexe a stočené na stolnej centrifuge. Pre každý pár primerov bol zhotovený master mix (MM = pufor, dNTPs (2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty), FWD (forward) a REV (reverse) primer, voda, enzým), ktorý bol po premiešaní rozdelený na samostatné reakcie a následne bol k nim pridaný templát. Vždy bola zhotovená negatívna

kontrola (NK) (miesto prídavku DNA do reakcie bol pridaný rovnaký objem vody pre udržanie koncentrácie reakcie) a templát určený k analýze (DNA z bunkových línií/organoidov) a po zavedení protokolu aj pozitívna kontrola (PK: MM + DNA /HEK-293 /PATU 8902). Táto reakcia prebiehala v objeme 10 µl. Veľkosť amplikónu bola skontrolovaný pomocou DNA elektroforézy (pozri kapitola 4.7). V prípade pozitívneho výsledku u analýz génu *CDKN2A* postup končí (zopakovaním rovnakého výsledku 2×) a u génov *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* bolo prístupné k príprave amplikónu k sekvenácii a to opäť prípravou popisovanej reakcie, tentokrát v objeme 20 µl. Amplikón z prvej PCR 10 µl reakcie bol využívaný ako templát následnej 20 µl z dôvodu obmedzeného množstva DNA a zvýšenia špecificity produktov. V prípade využívania produktu reakcie PCR ako templátu, bola NK vyhotovená s prídavkom rovnakého objemu z predchádzajúcej reakcie PCR NK. Takto pripravené reakcie boli určenej k následnému prečisteniu (v prípade pozitívneho výsledku overovaného na agarózovom gély) a sekvenácii.

Ak boli sekvenácie nečitateľné bola reakcia opakovane pripravená v 40 µl objeme pre zvýšenie množstva amplikónu. V prípade vzniku nešpecifického produktu bola reakcia opakovaná. V prípade negatívneho výsledku PCR bola reakcia taktiež opakovaná. PCR reakcia prebiehala v prístroji C1000 Touch Thermal Cycler (Bio rad).

A

Krok	teplota	čas	opakovania
počiatočná denaturácia	95 °C	5 min	1 ×
denaturácia	95 °C	20 s	30-35 ×
nasadenie primerov	podľa páru primerov (viz. tab. č. 3)	15 s	
elongácia	72 °C	20-30 s	
konečná elongácia	72 °C	1 min	1 ×
chladenie	12 °C		∞

B

Krok	teplota	čas	opakovania
počiatočná denaturácia	98 °C	30 s	1 ×
denaturácia	98 °C	10 s	30 ×
nasadenie primerov	60 °C	10 s	
elongácia	72 °C	20 s	
konečná elongácia	72 °C	5 min	1 ×
chladenie	12 °C		∞

Tabuľka č. 2: Protokol PCR reakcie používaný s využitím DNA polymerázy Pfu, Tws a Phusion (A) a Phusion Plus bez potreby optimalizácie nasadacej teploty primerov (B).

A

Phusion/Tws/Phusion plus	0,1 µl	0,2 µl	0,4 µl
5 X HF/Phusion Plus buffer	2 µl	4 µl	8 µl
2 mM dNTPs	1 µl	2 µl	4 µl
FWD primer 3 µM	1 µl	2 µl	4 µl
REV primer 3 µM	1 µl	2 µl	4 µl
voda	3,9 µl	7,8 µl	15,6 µl
Templátová DNA 10ng/ul	1 µl	2 µl	4 µl
výsledný objem	10 µl	20 µl	40 µl

B

Pfu	0,2 µl	0,4 µl	0,8 µl
10 x Pfu pufo + MgSO4	1 µl	2 µl	4 µl
2 mM dNTPs	1 µl	2 µl	4 µl
FWD primer 3 µM	1 µl	2 µl	4 µl
REV primer 3 µM	1 µl	2 µl	4 µl
voda	4,8 µl	9,6 µl	19,2 µl
Templátová DNA	1 µl	2 µl	4 µl
výsledný objem	10 µl	20 µl	40 µl

Tabuľka č. 3: Komponenty PCR reakcie s použitou koncentráciou a výsledným objemom pre DNA polymerázu Phusion, Tws, Phusion Plus (A) a Pfu (B).

4.7 DNA elektroforéza

Pre overenie veľkosti a prítomnosti PCR amplikónu bol pripravený 1,5 % agarózový gél (PCR agarose, kat. č. P045, Top-Bio s.r.o.) rozpustený v roztoku TBE (zloženie: Tris, kyselina boritá, EDTA), ktorý bol zriedený zo zásobného 5× koncentrovaného roztoku. Do aparatury, do ktorej bol naliaty roztok rozpustenej agarózy v TBE, boli vložené hrebienky pre vytvorenie jamiek. Gél tuhol približne 30 min. Po zatuhnutí bol gél vložený do TBE pufru (zriedený s H₂O z 5× koncentrovaného zásobného roztoku), kde do gélu boli nanesené vzorky pripravené na elektroforézu.

Príprava vzoriek prebiehala nasledovne: k 5 dielom DNA bol pridaný 1 diel zmesi nanášacieho pufru (Oragne DNA Loading Dye (6×), kat. č. R0631, ThermoFisher Scientific) a farby (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000×, kat. č. 41002, Biotium) pre vizualizáciu DNA v pomere 1:10 000. Nanášací pufo sa v elektrickom poli rozdelí na 2 zložky, kedy jedna z nich, Bromphenol blue putuje s fragmentami o veľkosti približne 110 bp a druhá Xylene cyanol FF s približne 1300 bp veľkými fragmentami vďaka čomu je možné sledovať priebeh elektroforézy. Takto pripravené vzorky boli spolu s 0,5 µg štandardu molekulových hmotností (M) (Thermo scientific GeneRuler DNA Ladder Mix, kat. č. SMO0331, Thermo scientific,) (obrázok č. 12), pre vizuálnu kontrolu veľkosti amplikónov, nanesené na gél. Fragmenty boli rozdeľované pri napätí 90 V po dobu 30 min. Po ich uplynutí bol gél vizuálne skontrolovaný pod UV svetlom (kat. č. 10 102713, Uvitec, UK) a odfotený na mobilný telefón. Takto vzniknuté fotografie boli upravené v programe ImageJ a to



nasledovne: prenesenie do čierneho-bielej a úprava jasnosti a kontrastu pre lepšiu viditeľnosť fragmentov na fotografii.

4.8 Prečistenie PCR reakcie

Amplikón o požadovanej veľkosti bol po delení pomocou agarózovej elektroforézy vyrezaný pod UV svetlom, za čo najkratšieho osvetlenia a vložený do 1,5 ml skúmavky. Vyrezaná časť gélu bola odvážená na váhach a ďalej izolácia prebehla podľa návodu výrobcu kitom Kit Agarose Gel Extraction Kit (kat. č. PP-202L, Jena Bioscience, Nemecko) nasledovne: na 1 diel (100 g) 1,5 % agarózového gélu náležia 3 diely (3× 100 µl) extrakčného pufru, ktoré boli zmiešané a spolu inkubované za občasného premiešania pri 60 °C 10 min. Následne bol pridaný 1 diel (100 µl) izopropanolu, zmes bola zamiešaná a prenesená do aktivovanej kolonky, ktorej aktivácia prebehla nasledovne: do kolonky, vloženej v zbernej nádobke, bolo napipetovaných 100 µl aktivačného pufru a centrifugovaných (10 000×g, 30 s). Kolonka s rozpusteným gélom bola stočená (10 000×g, 30 s) a následne 2× opláchnutá 700 µl premývacieho pufru a centrifugovaná (10 000×g, 30 s). Tekutina zo zbernej nádobky bola v každom kroku odstraňovaná. Pre elúciu bola kolonka vložená do čistej 1,5 ml skúmavky. Do stredu kolonky bolo nanosených 30 µl vody a inkubované 5 min pri RT a následne stočené (10 000×g, 5 min). DNA bola rozpustená do vody a jej čistota a koncentrácia bola zistená pomocou prístroja NanoDrop. PCR produkty boli po neúspešnej izolácii cez kolonky odosielané do Střediska sekvenování Mikrobiologického ústavu AVČR, v.v.i. (pozri kapitola 4.9), kde boli pomocou chromatografie či enzýmov nešpecificky prečistené.

4.9 Sekvenovanie podľa Sangeru

Vybrané exóny spolu s časťami príslušných intrónov boli po amplifikácii a kontrole veľkosti a kvality elektroforézou izolované z gélu, prípadne odosielané neprečistené priamo po kontrole. Amplikóny boli sekvenované v Středisku sekvenování DNA, Mikrobiologického ústavu AVČR v. v. i. (<http://www.biomed.cas.cz/mbu/lab119/onas.htm>). Neprečistené reakcie tu boli purifikované pomocou afinitnej chromatografie či enzýmov. Stredisko využíva automatický genetický analyzátor ABI PRISM 3130xl.

4.9.1 Analýza sekvenogramov

Sekvenácie boli zo strediska zasielané vo formáte .ab1 a .txt. Súbor vo formáte .ab1 so sekvenáčnymi dátami bol otvorený v programe Chromas. Získaná sekvencia bola v online nástroji SIM alignment (<https://web.expasy.org/sim/>) porovnaná s wt referenčnou sekvenciou získanou z NCBI. Rozdiely boli dohľadane a analyzované. Taktiež celý chromatogram bol analyzovaný manuálne s dôrazom na hotspot.

4.10 Lyzovanie buniek z bunkových línií a z *ex-vivo* pestovaných kultúr

K peletu buniek/organoidov v 1,5 ml skúmavke bolo pridaných 30-50 μ l lyzačného pufru v závislosti na veľkosti pelety. Vzorky boli inkubované 30 minút na ľade a následne stočené pre odstránenie bunečných čiastočiek (1000g, 5 min, 4°C). Koncentrácia proteínu bola následne určená metódou BCA (bicinchoninovej kyseliny) a vzorky boli uchovávané pri -20 °C. Zloženie lyzačného pufru bolo 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, 10% glycerol, pH 7,4, 1 mM PMSF, 1x koktejl proteázových inhibítorov (kat. č. P8340, Sigma-Aldrich).

4.11 Stanovenie množstva proteínu lyzátov

Metódou BCA bola vo vzorkách určená celková koncentrácia proteínu. Biuretovou reakciou za účasti BCA katióny medi zo soli CuSO_4 za prítomnosti peptidových väzieb reagujú so sodnými soľami BCA. Činidlo je pripravené v pomere 1 diel CuSO_4 a 50 dielov roztoku BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A, kat. č. 23223, ThermoFisher Scientific) a reakcia prebieha počas inkubácie pri 37 °C. Meraním absorbancie zafarbenej kvapaliny pri 562 nm a rade štandardov o známej koncentrácii BSA (5 – 50 μ g proteínu) (bovinného sérového albumínu) bola stanovená koncentrácia pripraveného lyzátu.

4.12 SDS elektroforéza a western blot

Príprava vzorku pre analýzu prebiehala nasledovne: bunečný lyzát o známej koncentrácii proteínov bol nariedený na požadovanú koncentráciu celkového proteínu s vodou a sample buffer s 10 % beta-mercaptoethanolom, ktorý bol 5 \times koncentrovaný. Výsledný celkový objem predstavoval 30 μ l/jamku. Následne bola vzorka povarená 10 min. Výsledná koncentrácia beta-mercaptoethanolu vo vzorku bola 2% (v/v).

Na základe molekulovej hmotnosti proteínov Smad4, p16, K-Ras a p53 boli pripravené gély o koncentrácii 10%, 12% a 15% (**tabuľka č. 4**) deliaceho gélu. Všetky ďalej obsahovali 4% zaostrovací gél. Chemikálie boli zmiešané postupne podľa **tabuľky č. 5** a naliate do pripravenej aparatury so sklami s priemerom 1,5 mm. Spodný gél bol po naliatí prevrstvený izopropanolom a po jeho zatuhnutí (približne 30 min) bol naň naliaty gél vrchný, zaostrovací, s hrebienkom (doba tuhnutia asi 20 min).

Tabuľka č. 4:

	gél	proteín
	10%	p16, p53
	12%	K-Ras
	15%	Smad4

A

spodný deliaci gél			
Chemikálie	15%	12%	10%
d H ₂ O	1,51 ml	3,11 ml	4,18 ml
30 % Akrylamid	8,00 ml	6,40 ml	5,33 ml
TRIS 8,8 pH	6,00 ml	6,00 ml	6,00 ml
SDS 5%	0,32 ml	0,32 ml	0,32 ml
TEMED	160 µl		
APS 10%	6 µl		

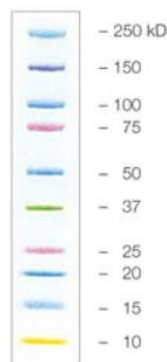
B

horný zaostrovací gél	
Chemikálie	4%
d H ₂ O	1,01 ml
30 % Akrylamid	0,35 ml
TRIS 6,8 pH 0,25 M	1,50 ml
SDS 5%	60 µl
TEMED	45 µl
APS 10%	8 µl

Tabuľka č. 5: Použité objemy jednotlivých chemikálií pre prípravu akrylamidového gélu o určitej koncentrácii pre spodný gél (**A**) a horný gél (**B**).

Vzorky boli napipetované do jamiek. Do prvej jamky bol nanosený rebrík (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, kat. č. 1610375, BioRad), čo predstavuje štandard s farebne označenými proteínmi o veľkostiach 10-250 kDa (**obrázok č. 13**) v objeme 10 µl. Do ďalších jamiek boli nanosené postupne vzorky a to 40 ng celkového proteínu na jamku v prípade lyzátu z bunkových línií a 20 ng celkového proteínu na jamku v prípade lyzátu organoidov.

Delenie v elektrickom poli prebiehalo v aparatúre Mini-protean III (BioRad). Zarovnávanie proteínov v hornom gély prebiehalo pri 75 V 40 min a po prejdení proteínov do spodného gélu bolo napätie zvýšené na 150 V, až kým čelo nedobehlo na koniec gélu (asi 1 hodinu). Po rozobraní aparatury bol gél priložený na PVDF membránu a pri



Obrázok č. 13: Použitý štandard pre overenie veľkosti detegovaného proteínu. Upravené podľa <https://www.bio-rad.com/en-cz/sku/1610375-precision-plus-protein-kaleidoscope-prestained-protein-standards?ID=1610375>

konštantnom prúde 0,3 A za 75 min boli proteíny prenesené na membránu, ktorá bola blokována v 5% mlieku bez tuku rozpustenom v TTBS 1 hodinu. Po opláchnutí, ktorý vždy predstavoval 3× 10 minút na kývačke s TTBS, membrána bola cez noc vložená do roztoku primárnej protilátky v TTBS (riedenia jednotlivých protilátok v **tabuľke č. 6**, výrobcu ABclonal) a po ďalšom oplachu vložená do roztoku sekundárnej protilátky a TTBS na 1 hodinu. Po poslednom opláchnutí a premytí v TBS bola membrána inkubovaná v substráte chrenovej peroxidázy West Femto(kat. č. 34096, Thermo Fisher Scientific). Signál bol detekovaný chemiluminiscenčnou reakciou na prístroji ChemiDoc. Úspešnosť prenosu proteínov na membránu bola kontrolovaná po skončení pokusu pomocou farby Coomassie Blue.

názov	použité riedenie
KRAS Rabbit Ab (kat. č. A1190)	1:500-1:1000
p53 Mouse mAB (kat. č. A10610)	1:500-1:2000
SMAD4 Rabbit mAb (kat. č. A119116)	1:500-1:2000
CDKN2A/p16INK4a Rabbit pAb (kat. č. A0262)	1:500-1:2000
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate Secondary antibody (kat. č. 170- 6515)	1:10000
Goat anti-Mouse IgG (H+L) CrossAdsorbed Secondary Antibody, HRP (kat. č. 31432)	1:10000

Tabuľka č. 6: Použité riedenia jednotlivých primárnych a sekundárnych protilátok v TTBS.

5 Výsledky

5.1 Analýza genomických databáz

Onkogenézi predchádzajú mutačné zmeny buniek. Analýzou veľkého množstva dát získaných v rôznych štúdiách zhromaždených v genomických databázach je možné vyhľadať opakujúce sa mutačné vzorce vyskytujúce sa v danom type nádoru, ktorý je možné si vyfiltrovať. Za účelom získania informácií o mutačných zmenách v PDAC bunkách boli využité databáze: TCGA (www.cancer.gov), cBioPortal (www.cbioportal.org) a COSMIC (cancer.sanger.ac.uk/cosmic). Tieto poznatky boli ďalej spracované a využité k určeniu postupu cieľenej mutačnej analýzy.

Prvým krokom bola analýza spektra mutovaných génov detegovaných v PDAC. 20 najfrekvencovanejších mutovaných génov (frekvencia <2,5 %) je zobrazených v **obrázku č. 14**. Ten bol vytvorený v databáze TCGA, kde bol vybrané pankreas ako „primary site“. V štúdiách, ktoré TCGA ponúkla bolo 315 prípadov PDAC, s uvedenými génmi najčastejšie alternovanými. Tento graf predstavoval predbežný odhad a charakter mutácií vyskytujúcich sa v PDAC. Získaná predstava bola podporená dvomi ďalšími webovými portálmi a to cBioPortal a COSMIC (pozri kapitola 5.1.1). Popisovaná analýza TCGA je dostupná na tomto odkaze: <https://bit.ly/2VpMtZ7>.



Obrázok č. 14: Analýza najčastejšie mutovaných génov detegovaných v genómoch PDAC a ich frekvencia výskytu u analyzovanej vzorky (312 prípadov). Upravené z <https://bit.ly/2VpMtZ7>.

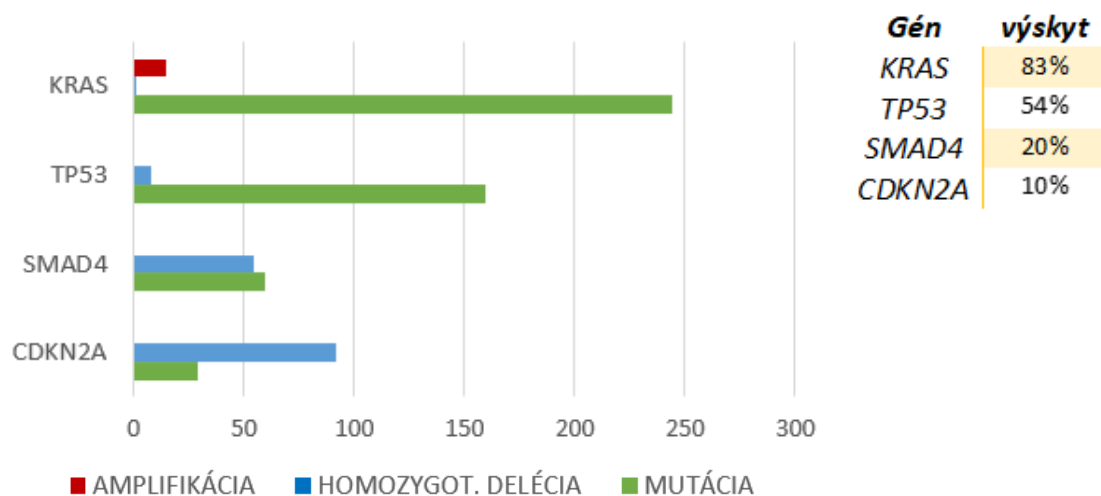
Podľa použitých databáz najčastejšie dochádza k alternáciám v 4 génoch, z ktorých je jedným proto-onkogén *KRAS* a TS gény *TP53*, *SMAD4* a *CDKN2A*.

Výhradne tieto 4 gény boli určené k ďalšej analýze, keďže k ich mutáciám dochádza s výrazne vyššou frekvenciou (ostatné gény sú mutované s frekvenciou menšou ako 10 %).

5.1.1 In silico analýza genetických alternácií génov *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*

Vybrané gény boli ďalej analyzované kvôli zisťovaniu presného charakteru onkogénnej mutácie v dostupnej literatúre a databázach. V databáze cBioPortal boli vyfiltrované dáta z dvoch štúdií, t.j. Pancreatic Cancer Nat Comm 2015 (Witkiewicz et al., 2015) a štúdie označenej ako „PDAC Firehose Legacy“, obsahujúcich mutačnú analýzu aj copy-number analýzu, celková kohorta 295 vzoriek. Tieto štúdie boli zaradené do našej analýzy na základe toho, že poskytujú možnosť filtrovať striktne vzorky pacientov s duktálnym karcinómom, obsahujúce mutačnú analýzu a analýzu počtu alel („copy number analysis“). Základný prehľad genomických alternácií obsahuje homozygotné delécie („deep deletion“), amplifikáciu („amplification“) a mutácie (rôzne typy jedno-nukleotidových polymorfizmov). Prehľad je zobrazený v **obrázku 15A**. V nasledujúcich krokoch je možné analyzovať samotné mutácie (polymorfizmy) pre jednotlivé zvolené gény, tj. *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4* (frekvencia výskytu 83 %, 54 %, 20 % a 10 % z celkovej kohorty). Grafické zobrazenie typov mutácií (polymorfizmov), ku ktorým dochádza frekventovane v PDAC vo vybraných 4 génoch, je v **obrázku 15B**. Analýza v databáze cBioPortal je dostupná na tomto odkaze: <https://bit.ly/2VmquIR>.

A PREHĽAD GENETICKÝCH ALTERNÁCIÍ V PDAC



B KRAS



TP53



SMAD4



CDKN2A



■ MISSENSE ■ NONSENSE ■ FRAMESHIFT INSERTION ■ FRAMESHIFT DELETION ■ IN FRAME INSERTION ■ SPLICE

Obrázok 15: Typy genetických alternácií často postihujúce bunky PDAC v 4 najčastejšie mutovaných génoch *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*. V tabuľke v pravej časti je prepočítaný počet substitučných mutácií v analyzovanej vzorke na percentá postihnutých prípadov (A). Zobrazenie druhov bodových mutácií, ktoré sa vyskytujú v PDAC v analyzovaných génoch s frekvenciou výskytu. Veľkosť kruhu grafu odráža početnosť výskytu tohto typu alternácie v jednotlivých génoch v PDAC (B). Zdroj <https://bit.ly/2VmqlR>.

Podobnú analýzu sme urobili aj na portáli TCGA. Ako inklúzne kritériá pre výber vzoriek boli zvolené: v záložke „primary site“ filtrované dáta z pankreasu a v „sample type“ boli filtrované dáta z primárnych nádorov. Zároveň sme filtrovali iba dáta z mutácií, ktoré sú obsiahnuté v databáze COSMIC. Vygenerované dáta predstavujú štatistiky genetických alternácií pre zvolený filter, t.j. pankreatické primárne nádory, celková kohorta 315 prípadov. Kvalitatívne sú dáta z TCGA rovnaké ako z cBioPortal. TCGA na rozdiel od cBioPortal ponúka

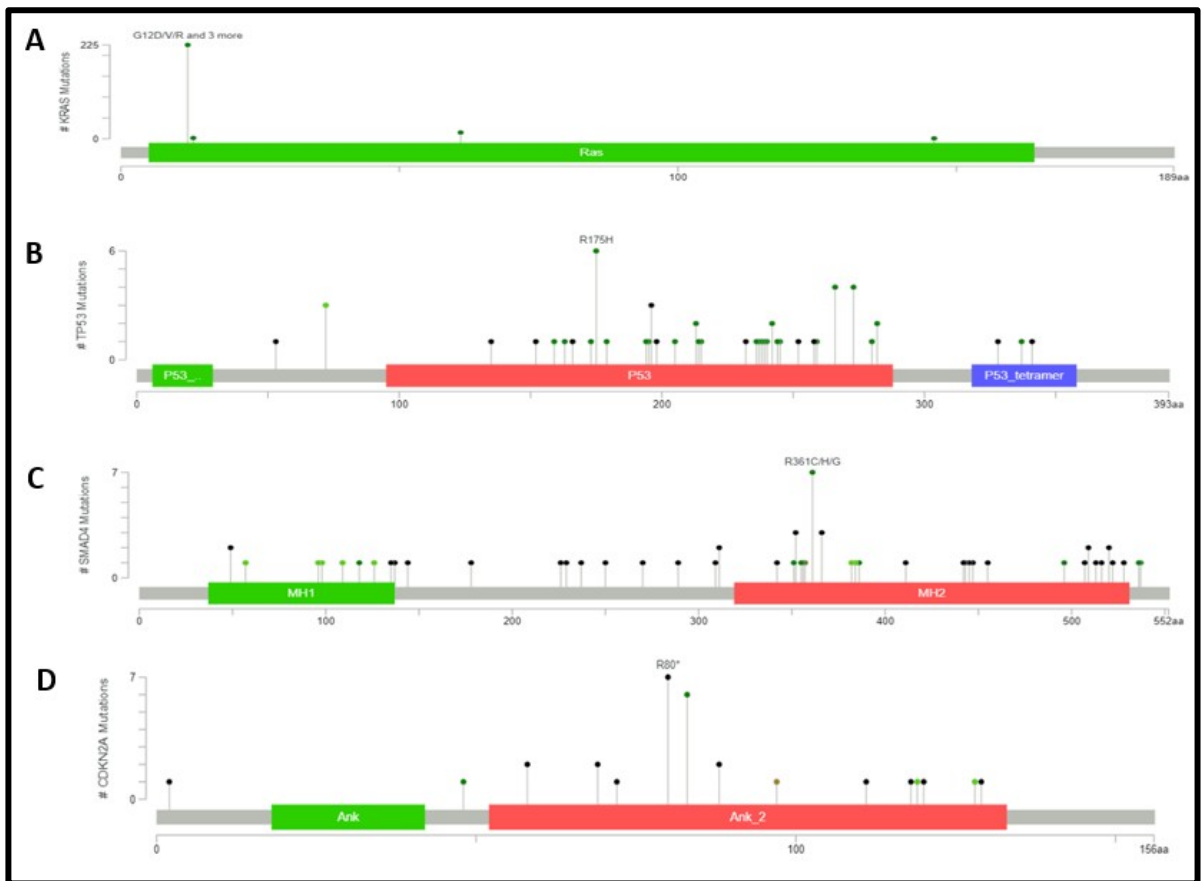
priamo štatistiku jednotlivých mutácií s možnosťou ich radenia. Pre KRAS, celkový počet typov mutácií vo zvolenej kohorte je 15, pre TP53 140, pre CDKN2A 49 a pre SMAD4 56 (pozri <https://bit.ly/3jzCljf>). Ďalej sme v TCGA nechali zoradiť jednotlivé mutácie podľa početnosti vo zvolenej kohorte. Tieto dáta sú zobrazené v **obrázku č. 16** (pre mutácie s frekvenciou väčšou ako 1,8%).



Obrázok č. 16: Najčastejšie sa vyskytované druhy mutácií v PDAC s frekvenciou vyššou ako 1,8 % v analyzovanej vzorke. Upravené z <https://bit.ly/379ZkBa>.

Jednotlivé vzorky sú podobne ako v cBioPortal charakterizované typom mutácie (substitúcia, inzercia, delécia). Medzi génmi často postihnutými substitučnou mutáciou sa nachádzajú gény *KRAS*, *TP53* a *CDKN2A* (**obrázok č. 16**). Posledný z analyzovaných génov, gén *SMAD4*, sa v tejto vzorke pacientov vyskytuje s frekvenciou 1,21 %, konkrétne substitúcia R361C. S rovnakou frekvenciou sa v tejto vzorke vyskytuje aj mutácia v géne *GNAS*, konkrétne R844H a s frekvenciou 3,03 % transkript *DNMT1P4*. Tieto neboli vybrané k ďalšej analýze. Analýza databáze TCGA je dostupná na odkaze: <https://bit.ly/379ZkBa>.

Bodové mutácie boli následne vyhľadane a označené hotspot miesta vybraných 4 génov. Hotspot miesta sú graficky zobrazené v **obrázku č. 17**.



Obrázok č. 17: Grafické zobrazenie alternácií, ku ktorým dochádza s vyznačenou frekvenciou v určitých aminokyselinách zobrazené pre proteíny K-Ras (A), p53 (B), Smad4 (C), a p16 (D). Zdroj <https://bit.ly/2VmqlR>

Ďalej sme overili dáta s pomocou COSMIC analýzy, kde bol dosiahnutý podobný výsledok. Analýza dostupná na odkaze: <https://bit.ly/3lfVEWH>.

Overenie získaného prehľadu predstavovala zhoda v troch odlišných databázach a bolo možné sa v ďalších krokoch riadiť získanými vzorcami.

Navrhnutý postup analýzy pre jednotlivé gény zvolený na základe dát získaných *in silico* analýzou:

Mutácie KRAS

Väčšina vzoriek, ktoré obsahovali mutačnú analýzu bolo mutovaných v kodóne 12, takmer 90 %. V menšom počte je alela amplifikovaná a mutovaná zároveň. Všetky mutácie sú substitučné. S nižšou frekvenciou k nim dochádza aj v kodónoch 13 a 61. Tieto výhradné tri miesta sa nachádzajú na exónoch 2 a 3. Preto bola ich analýza zvolená formou sekvenovania exónov 2 a 3. Grafické zobrazenie rozloženia mutácií v sekvencii proteínu je v **obrázku č. 17A**.

Mutácie TP53

V géne *TP53* v PDAC dochádza k desiatkam mutácií, ktoré zasahujú gén po celej jeho sekvencii. Je však možné pozorovať určitý vzorec a to taký, že najčastejšie sú mutácie sústredené do DBD domény. Najfrekvencovanejšie mutácia *TP53* v PDAC je podľa cBioPortal R175H (11/295), ktorá je onkogénna (Chang et al., 2016; Gao et al., 2017). Missense mutácie tvoria majoritu genetických alternácií, množstvo z nich sú onkogénne. Mutované sú frekvencovane exóny 5, 6, 7 a 8 (DBD proteínu), preto boli zvolené k sekvenácii. Grafické zobrazenie rozloženia mutácií v sekvencii proteínu je v **obrázku č. 17B**.

Mutácie SMAD4

TS gén, je mutovaný v rovnakej miere ako homozygotne deletovaný. Samotné mutácie sú najčastejšie nonsense a frameshift delécia/inercia. Bodové mutácie podľa dát z databáz postihujú najmä exóny 3, 9 a 12, ktoré budú sekvenované. Grafické zobrazenie rozloženia mutácií v sekvencii proteínu je v **obrázku č. 17C**.

Mutácie CDKN2A

Najčastejšia je homozygotná delécia. Zastúpené mutácie sú nonsense a frameshift delécia/inercia, ktoré sa prejavujú predčasným stop-kodónom a teda skrátením proteínu. Prítomnosť génu bude analyzovaná PCR amplifikáciou exónov 2 a 3. Grafické zobrazenie rozloženia mutácií v sekvencii proteínu je v **obrázku č. 17D**.

Výsledným krokom analýz bolo vytvorenie primerov pre amplifikáciu určených úsekov génov, ktoré boli navrhnuté s ohľadom na nasledovnú sekvenáciu (pozri **obrázky č. 8-11**) a výber protilátok.

5.1.2 *In silico* analýza mutácií v bunkových líniiach

Pre zavedenie analýzy a overenie jej účinnosti bolo potrebné ju otestovať na vzorkách so známym genetickým pozadím analyzovaných génov. Za týmto účelom boli vybrané bunkové línie dostupné na pracovisku. K mapovaniu dostupných mutácií na bunkových líniiach bol použitý webový portál obsahujúci genomické dáta cBioPortal, kde boli zvolené tri dostupné štúdie obsahujúce dáta bunkových línii, tj. Cancer cell line Encyclopedia (Ghandi et al., 2019; Nusinow et al., 2020) Cancer Cell Line Encyclopedia (Barretina et al., 2012) NCI_60 Cell Lines (Reinhold et al., 2012) a gény *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4*. V ponuke „OncoPrint“ a „Mutations“ boli vyhľadane bunkové línie a zaznamenané ich genetické alternácie v

požadovaných génoch. Prehľad mutácií získaných z cBioPortal je uvedený v **tabuľke č. 7**. Analýza databáze cBioPortal dostupná na odkaze: <https://bit.ly/3s3Q23h>.

	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>SMAD4</i>
PATU 8902	G12V	C176S		homodeletion
PANC1	G12D	R273H	homodeletion	amplification
MiaPaCa2	G12C	R248W	homodeletion	
BT474		E285K	homodeletion	
T47D		L194F		
MCF7			homodeletion	homodeletion [#]
CAL51				
Hs578T		V157F	homodeletion	
MDA-MB-231	G13D	R280K	homodeletion	
HCT116	G13D			
HEK293				
HELA				

Tabuľka č. 7: Analýza alternácií v sledovaných génoch u dostupných bunkových línií v databázach. Prázdne pole predstavuje wt formu génu. Zdroj <https://bit.ly/3s3Q23h>.

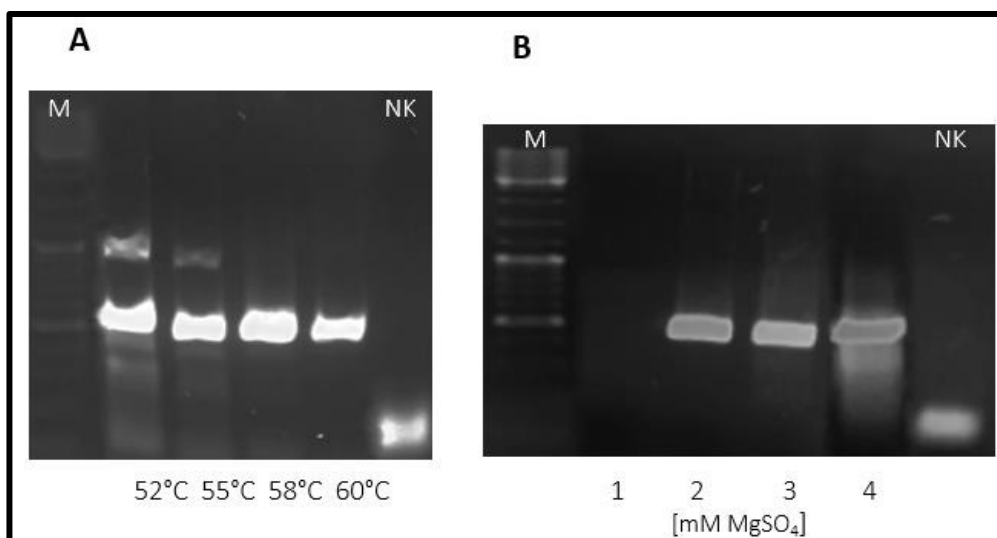
[#] v jednej štúdii z troch

5.2 Optimalizácia zvolenej analýzy

5.2.1 Optimalizácia PCR

K optimalizácii všetkých krokov postupu boli využité nasledovné bunkové kultúry: pankreatické nádorové (MiaPaCa2, PANC1 a PATU 8902) a embryonálnej línia (HEK-293). Ďalej boli využívané ako PK.

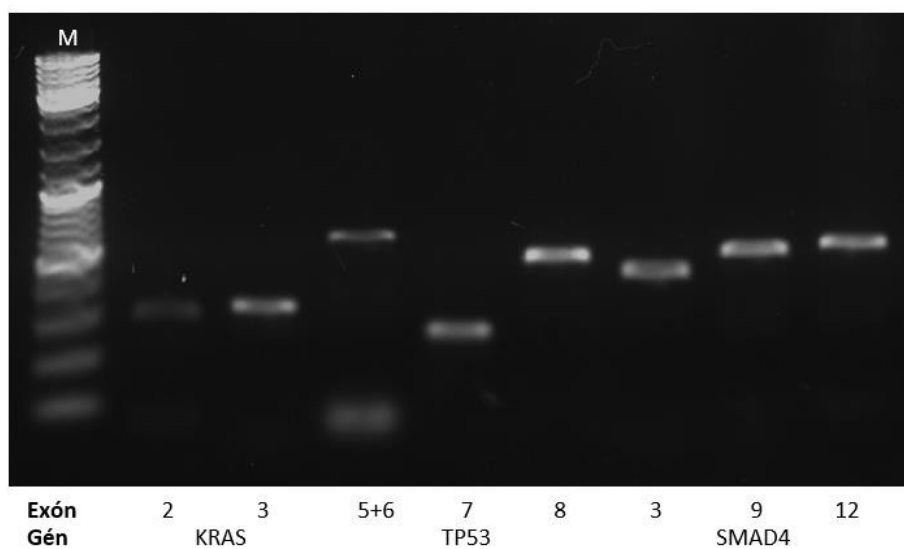
K zisteniu optimálnej teploty nasadenia primerov bolo pre každý pár využité gradientové PCR, teda rovnaká reakcia cykľujúca pri inej teplote nasadenia primerov (teploty zvolené okolo teploty topenia pre primery páru vypočítanej pomocou nástroja Primer3) (**obrázok č. 18A**). Výsledná teplota nasadenia bola zvolená tak, aby pri reakcii vznikol vždy jeden špecifický prúžok v čo najväčšom množstve. Podobným spôsobom boli zvolené aj dĺžky jednotlivých cyklov a koncentrácia MgSO₄ (**obrázok č. 18B**).



Obrázok č. 18: Gradient PCR génu KRAS exón 2, HEK-293 genóm (A) PCR s prídavkom MgSO₄ gén KRAS, exón 2, HEK-293 genóm (B).

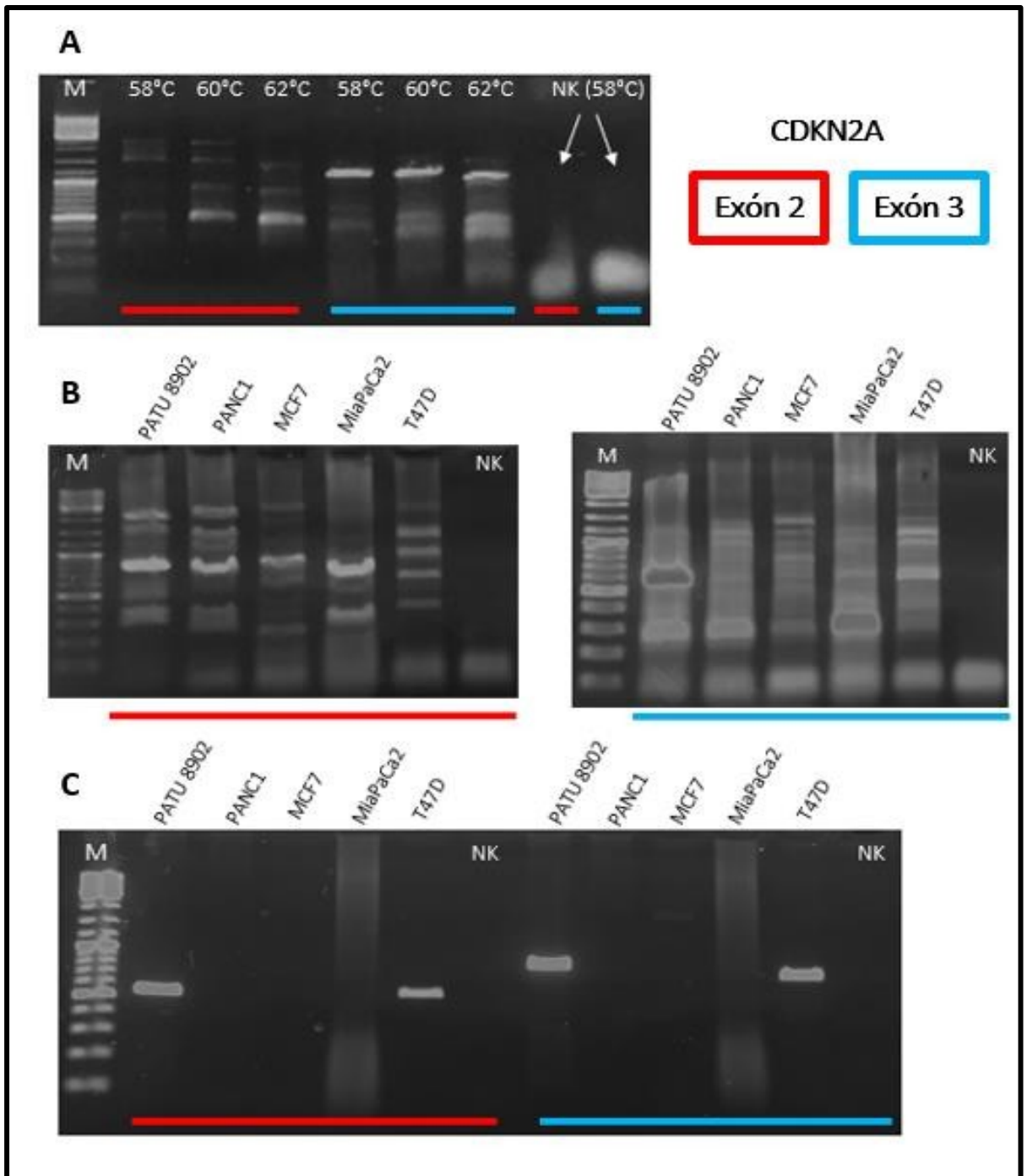
Vzhľadom na nedostatok materiálu k analýze bol testovaný minimálny obsah DNA v reakcii. Tím bolo zistené, že je možné použiť 5 ng DNA na 10 µl reakciu. Zvolený obsah DNA v reakcii bol stanovený na 10 ng DNA na 10 µl reakciu.

Ukážka PCR produktov vybraných úsekov génov *KRAS*, *TP53* a *SMAD4* vytvorených optimalizovaným protokolom s DNA 293-HEK je zobrazená na obrázku (**obrázok č. 19**). Ďalej využívané ako PK. Zavedený protokol bol použitý na líniiach MiaPaCa2, PANC1 a PATU 8902. Vytvorené 20 µl reakcie boli sekvenované.



Obrázok č. 19: PCR amplikóny jednotlivých exónov a častí priľahlých intrónov. Použitý genóm HEK-293.

Primery pre exón 2 a 3 génu *CDKN2A* vykazovali nešpecifické nasadenie a to aj pri teplote 62 °C, i so zvyšujúcou teplotou nasadenia primerov sa špecifita reakcie nemenila (**obrázok č. 20A**). Preto bol navrhnutý ďalší pár primerov pre tieto exóny, avšak v reakcii opäť dochádzalo k tvorbe nešpecifických produktov. Oba páry primerov boli testované na bunkových líniách u ktorých, podľa databáz, je tento gén deletovaný a to u línií PANC1, MCF7, MiaPaCa2 a líniách PATU 8902, T47D majúcich formu wt (**obrázok č. 20B**). Vo vzniknutých produktoch nebol pozorovaný taký rozdiel, aby sa dalo jednoznačne určiť či došlo k delécii sledovaného génu alebo nie. Produkty reakcií s použitím jedného aj druhého páru primerov boli nešpecifické. Následne bola pre reakciu využitá polymeráza Phusion Plus, ktorej od výrobcu definované prostredie napomáha stabilizácii diméru primer-templát čím zvyšuje špecifitu reakcie (<https://bit.ly/3AcSoQg>). Reakcia s využitím tejto polymerázy na rovnakých templátoch (PATU 8902, PANC1, MCF7, MiaPaCa2 a T47D) s využitím primerov označených v **tabuľke č. 1** ako *CDKN2A-2.0* je zobrazená v **obrázku č. 20C**. Oba úseky DNA bolo možné špecificky naamplifikovať u línií T47D a PATU 8902 a produkt nevzniká u línií PANC1, MiaPaCa2 a MCF7 (úsek sa v genóme nenachádzal). Výsledky sa zhodujú s údajmi získanými z databáz a zapísanými v **tabuľke č.7**. K ďalšej analýze boli zvolené páry primérov *CDKN2A-2.0*.



Obrázok č. 20: Zavedenie analýzy génu *CDKN2A* a jeho exónov 2 a 3 metódou PCR. Exón 2 je označený červenou farbou a exón 3 modrou. Gradient PCR na HEK-293 DNA s negatívnou kontrolou (NK). Použitý pár primerov *CDKN2A*, polymeráza Tws (**A**). PCR analýza bunčných línií v poradí PATU 8902, PANC1, MCF7, MiaPaCa2 a T47D s rozličným genetickým pozadím. Využitá polymeráza Phusion (**B**). Analýza rovnakých línií ako na obrázku B, použitá polymeráza Phusion Plus (**C**). Použité páry primerov v obrázkoch **B** a **C**: *CDKN2A*-2.0.

5.2.2 Prečistenie reakcie a sekvenácia

Po zavedení PCR amplifikácie mohlo byť pokročené k ďalšiemu kroku a amplikóny boli pripravované k sekvenačnej reakcii. Pre čitateľnosť sekvenačnej reakcie je nevyhnutný presný pomer dNTP/ddNTP a prítomnosť primeru v požadovanom smere (Sanger et al., 1977). Preto je nutné PCR reakciu pred samotnou sekvenáciou prečistiť. S týmto účelom bola PCR reakcia spolu s farbičkou rozdelená v agarózovom géle. Po prebehnutí delenia DNA o rôznych veľkostiach v elektrickom poli boli amplikóny o požadovanej veľkosti vyrezané a pomocou kitu: Kit Agarose Gel Extraction Kit prečistené. Výťažok z izolácie kolonkou bol však príliš nízky a nedostačujúci pre sekvenačnú reakciu. Preto muselo byť použité nešpecifické prečistenie od nukleotid trifosfátov, primérov, enzýmov a zložiek pufru, ktorých prítomnosť v reakcii neumožní jej čitateľnosť.

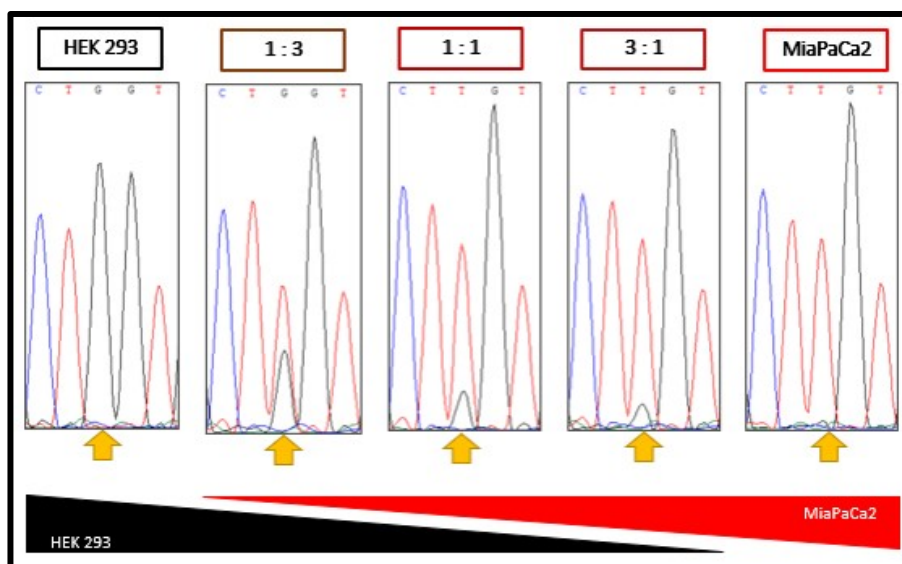
Výsledky sekvenácií na pankreatických bunkových líniách po jednotlivých exónoch sú uvedené v **tabuľke č.8**.

gén	KRAS		TP53				SMAD4		
exón	2	3	5	6	7	8	3	9	12
PATU 8902	G12V	wt	C176S	wt	wt	wt	wt	wt	wt
PANC1	G12D	wt	wt	wt	R248W	wt	wt	wt	wt
MiaPaCa2	G12C	wt	wt	wt	wt	R273H	wt	wt	wt

Tabuľka č. 8: Výsledky sekvenácií amplikónov bunkových línií, zobrazené pre jednotlivé vybrané exóny.

5.2.3 Detekčná hranica mutácií u vzoriek s heterogénnym pozadím

Vzorky organoidov predstavujú nehomogénnu bunkovú zmes (subpopulácie rakovinových buniek, fibroblasty a imunitné bunky) a preto bolo potrebné zistiť, pri akom percentuálnom zastúpení ešte sme schopní zachytiť vlastnú mutáciu v zmesi. Pripravili sme zmes DNA vyizolovanej z bunkových línií s formami wt (293-HEK) a mutáciou p.G12C (MiaPaCa2) v pomere 3:1, 1:1 a 1:3 a urobili PCR s primermi pre amplifikovanie exónu číslo 2, génu *KRAS*. PCR produkty sa po prečistení osekvenovali. Jednotlivé časti sekvenogramov reprezentujúce sekvenciu kodónu G12 a príľahlé nukleoidy, zoradené podľa vzostupnej koncentrácie mutovanej formy (DNA MiaPaCa2), a zostupnej koncentrácie wt formy (DNA HEK-293) zobrazené v **obrázku č. 21**. V našich podmienkach je možné detegovať mutáciu ak je v zmesi 25 % tejto alely, avšak v závislosti na kvalite analyzovanej sekvenácie.



Obrázok č. 21: Úseky sekvenogramov exónu 2 génu *KRAS*. Ako templát bola použitá zmes DNA z bunkových línií HEK-293 (naľavo) wt forma a MiaPaCa2 (napravo) mutovaná forma, v pomeroch 1:0, 1:3 a 1:1. Z ľavej strany smerom do pravej strany sledujeme zmenšujúci sa peak wt sekvencie (oranžová šípka). Obrázky sekvenogramov vytvorené v programe Chromas.

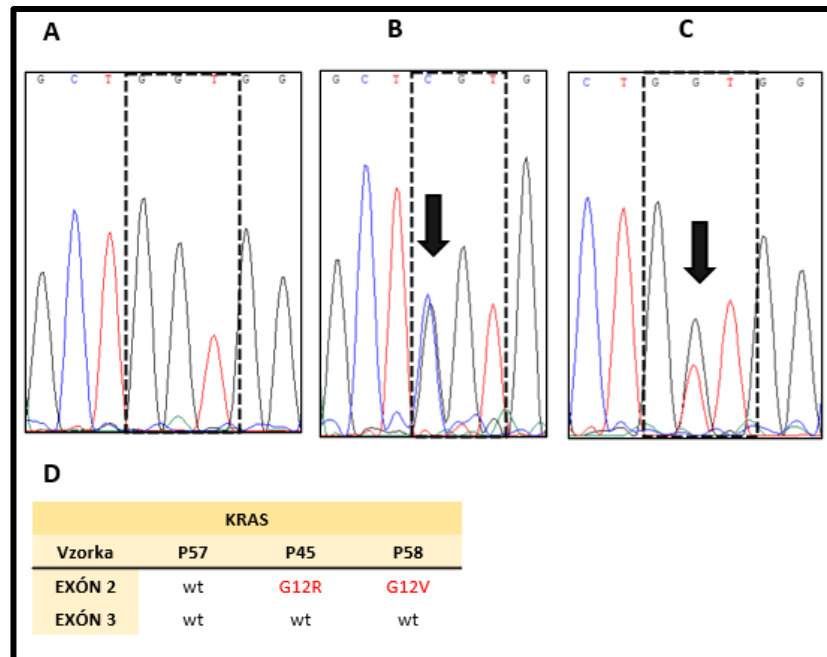
5.3 Analýza vzoriek z primárnych organoidov PDAC

Počas spracúvania diplomovej práce boli v laboratóriu prijaté, vypestované a odobrané na analýzu tri primárne kultúry označené P57, P45 a P58. Následne bola vyizolovaná DNA z vypestovaných organoidov. Výťažky izolácií vzoriek predstavovali približne 1 µg genómovej DNA. Optimalizovaný protokol bol použitý na genómovú DNA *ex-vivo* pestovaných organoidov.

5.3.1 KRAS

Rovnakým spôsobom prebiehala analýza organoidov P57, P45, P58 ako u bunkových línií. Po amplifikácii špecifického produktu pre exóny 2 a 3 boli osekvenované. Sekvenogram bol prehľadný a jednotlivé mutácie bolo jednoznačne možné odhaliť. Objavené mutácie a časti sekvenogramov sú zobrazené spolu s detegovanými variantami v **obrázku č. 22**.

U najčastejšie mutovaného génu v PDAC pozorujeme u našich vzoriek jednu nemutovanú formu (P57) a u vzoriek P45 a P58 sledujeme varianty v kodóne 12.

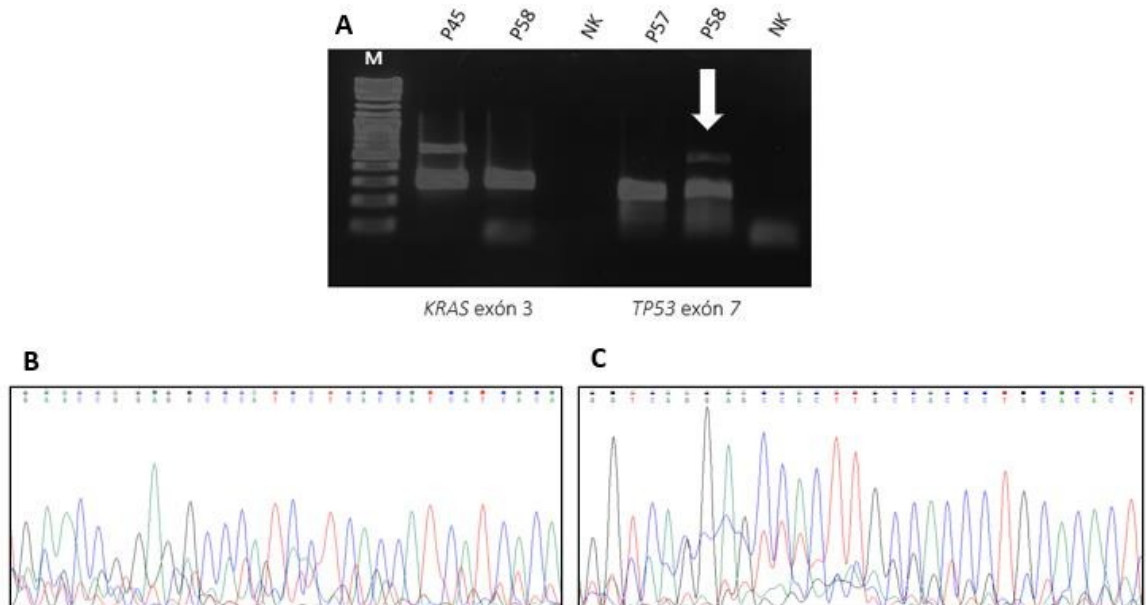


Obrázok č. 22: Časť sekvenogramov zo sekvenácie exónu 2 génu *KRAS* genómu organoidov P57 (wt sekvencia) (A), P45 (B) a P58 (C). Nájdené odlišnosti oproti wt sekvencii sú označené čiernou šípkou. Súhrnná tabuľka zobrazujúca výsledky sekvenácií vzoriek organoidov v exónoch 2 a 3 (D). Obrázky sekvenogramov vytvorené v programe Chromas.

5.3.2 TP53

Amplifikácia vybraných úsekov *TP53* prebehla optimálne, PCR produkty boli prečistené a osekvenované. Hranica čitateľnosti sekvenogramu bola predpokladaná po prvých 50 bázach. Tento fakt bol braný do úvahy pri designovaní primerov. Aj keď bol vytvorený špecifický PCR produkt, sekvenogramy *TP53* amplikónov boli veľmi zle čitateľné z dôvodu vysokého pozadia aj s použitím rôznych DNA polymeráz. Jeden príklad PCR produktu a následne zle čitateľného sekvenogramu je v **obrázku č. 23**. V prípade niektorých sekvenácií nie je možné čítať prvých približne 100 bází, taktiež sekvenogramy exónu 7 od P57 a exónu 8 od P45 a P58 neboli čitateľné vôbec aj po niekoľkých opakovaníach. Sekvenogramy boli analyzované individuálne a bodové mutácie vyhodnocované empiricky. Identifikovali sme niekoľko substitučných mutácií a jednu nonsense mutáciu, ktoré sú uvedené v **tabuľke č. 9** pre jednotlivé exóny 5 (9A), 6 (9B) a 7 (9C). Najčastejšie reportované onkogénne hotspot mutácie v miestach p.R175 a p.R248 neboli v našich vzorkách identifikované. Exón 8 genómu vzorky P57 neobsahoval žiadnu alternáciu.

Pozorujeme skutočnosť, že v tomto najčastejšie alternovanom proteíne v ľudských nádoroch (<https://dcc.icgc.org/projects>) genóm P57 neobsahuje žiadnu substitučnú zmenu (v osekvenovných úsekoch).



Obrázok č. 23: Príklad PCR produktov (A), ktoré boli odoslané k následnej sekvenácii a výsledné sekvenogramy exónu 7 génu *TP53* genómu vzorky P58, s vysokým pozadím a ťažko čitateľný. Oblasť sekvenogramu 69 – 99 (B) a oblasť 113 – 142 (C). Amplikón genómu P57, pre gén *TP53* exón 7 po sekvenácii nebol čitateľný vôbec.

TP53 EXÓN 5							
WT		P57		P45		P58	
poradie	kodón	kodón	amk.	kodón	amk.	kodón	amk.
R156	CGC					GGC	G
H168	CAC					CAG	R
C176	TGC			TACAAC	Y/N	AGC	S
P177	CCC					CCG	P

TP53 EXÓN 6							
WT		P57		P45		P58	
poradie	kodón	kodón	amk.	kodón	amk.	kodón	amk.
Q192	CAG			CAT	H		
R196	CGA			CCA	P		
E198	GAA					GGA	G
L206	TTG					TAG	•
D208	GAC					GGC	G
F212	TTT					TTA	L
S215	AGT			ACT	T		
V218	GTG			GTA	V		

TP53 EXÓN 7					
WT		P45		P58	
poradie	kodón	kodón	amk.	kodón	amk.
G245	GGC	GTC	V	GCC	A
R248	CGG	CGC	R		
R249	AGG	ACA/ACG	T		
P250	CCC	CAC	H		
I251	ATC	ATA	I		

TP53			
Vzorka	P57	P45	P58
EXÓN 5	sekv.	sekv.	sekv.
EXÓN 6	sekv.	sekv.	sekv.
EXÓN 7	x	sekv.	sekv.
EXÓN 8	sekv.	x	x

Tabuľka č. 9: Detegované zmeny vo vzorkách v porovnaní s wt sekvenciou génu *TP53* v exónoch 5 (A), 6 (B) a 7 (C). V exóne 8 nebola objavená žiadna zmena. Súhrnná tabuľka zobrazujúca osekvenované úseky a tie, ktorých sekvenácia nebola čitateľná (D).

5.3.3 SMAD4

Rovnaký spôsobom boli sekvenované alternácie v hotspot miestach génu *SMAD4* v genómoch organoidov. Amplifikácia pomocou PCR prebehla úspešne a bol vytvorený pre každú vzorku špecifický produkt o požadovanej veľkosti pre každý exón. Tieto produkty boli odoslané k prečisteniu a sekvenácii. V obdržanom sekvenograme však bolo často vysoké pozadie a alternácie s nízkym podielom výskytu nebolo možné odčítať prípadne nebolo ani možné stanoviť sekvenciu na začiatku sekvenogramu (prvých približne 100 bází). Z tohto dôvodu samotný alignment nepostačuje. Ku každému sekvenogramu sme teda pristupovali opäť individuálne a s prihliadnutím na vysoké pozadie boli sekvenácie ručne spracované. Objavené alternácie oproti wt genómu sú v poradí kodónov zobrazené v **tabuľke č. 10**.

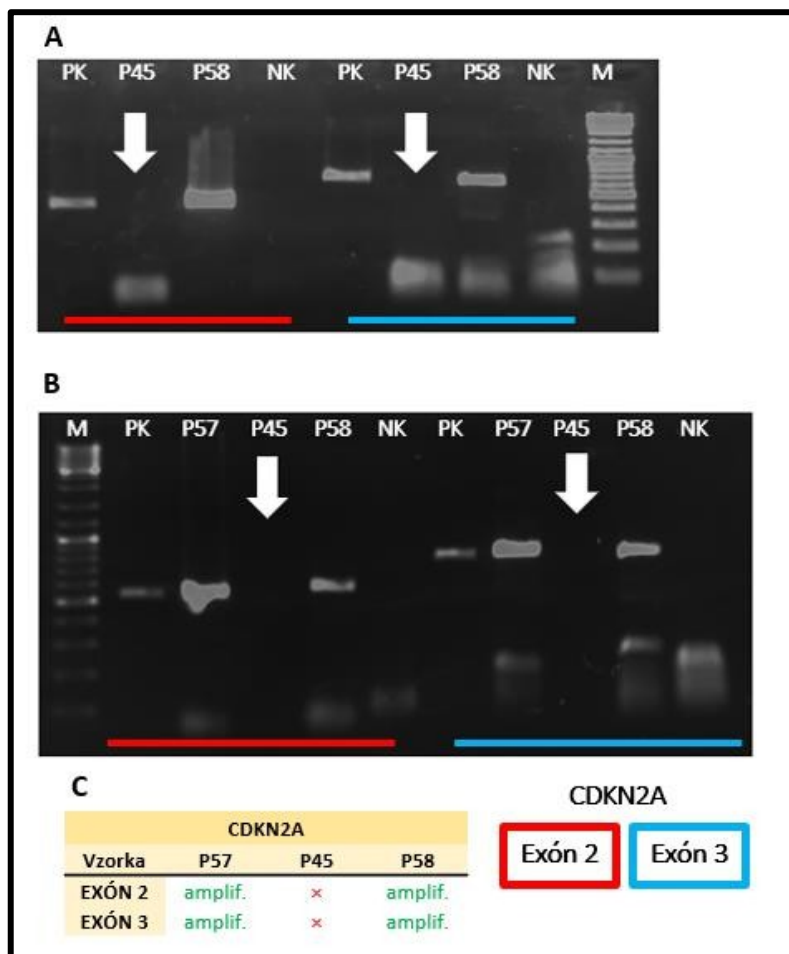
V analyzovaných exónoch genómu P58 sa nenachádzajú žiadne varianty génu, *SMAD4* je preto u vzorky P58 považovaný za wt a u P45 a P57 za mutovaný.

SMAD4							
WT		P57		P45		P58	
poradie	kodón	kodón	amk.	kodón	amk.	kodón	amk.
P130	CCA			CCG	P		
E134	GAA	AAA	K				
S368	TCC			CCC	P		

Tabuľka č. 10: Detegované zmeny vo vzorkách organoidov v porovnaní s wt sekvenciou v géne *SMAD4* a jeho exónoch 3, 9 a 12.

5.3.4 CDKN2A

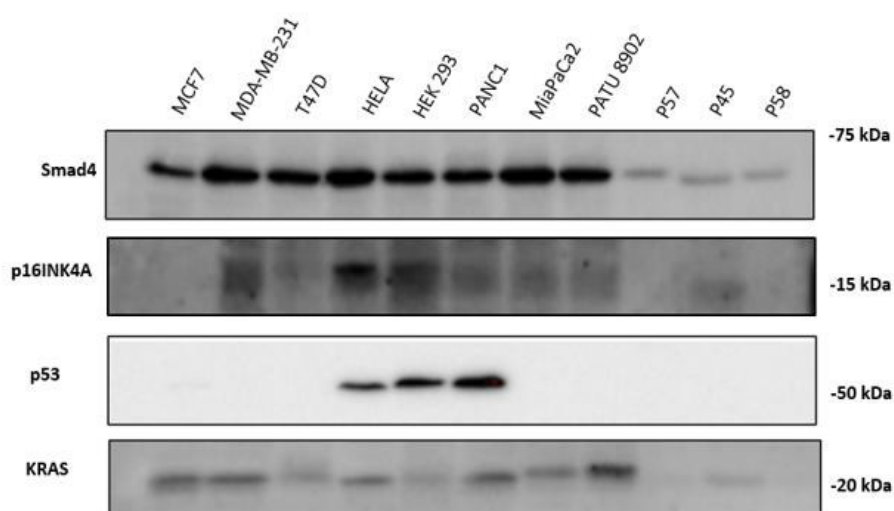
Obrázok č. 24 zobrazuje elektroforetickú kontrolu prítomnosti amplikónov po prebehnutí reakcie PCR s primermi CDKN2A-2.0 pre oba exóny s PK, NK a DNA vzoriek P57, P45, P58. U P57 a P58 boli oba požadované úseky genómu opakovane amplifikované PCR reakciou. U vzorku P45 nevzniká žiadny produkt v PCR reakciách, preto oblasť exónov 2 a 3 môže byť deletovaná.



Obrázok č. 24: Amplifikácia formou PCR z PCR exónov 2 (červená) a 3 (modrá) génu *CDKN2A*. Na obrázku bola kontrolovaná prítomnosť a veľkosť amplikónov u pozitívnej kontroly (Pk, DNA HEK-293), negatívnej kontroly (NK) a vzoriek s neznámym genetickým pozadím. Z DNA organoidov P45 nebol naamplifikovaný určený úsek DNA (biela šípka). Opakované 2 x. U DNA zo vzoriek P57 a P58 bol metódou PCR namnožený požadovaný úsek genómu (A, B). V spodnej časti obrázka sa nachádza tabuľka, ktorá zhŕňa výsledky experimentu (C).

5.4 Analýza western blotom

Prítomnosť určených proteínov v bunkách bola analyzovaná za pomoci špecifických monoklonálnych protilátok. Použitie protilátok a ich špecifická väzba bola testovaná na lyzátoch dostupných bunecných línií a podľa kontrol odporúčaných výrobcami. Organoidy P57, P45 a P58 boli zozbierané a tiež použité k semikvantifikačnej analýze metódou WB. Samotnej analýze predchádzalo lyzovanie buniek a stanovenie koncentrácie celkového proteínu. Následne boli na gél nanesené súčasne kontroly formou bunecných línií MCF7, MDA-MB-231, T47D, HELA, HEK 293, PANC1, MiaPaCa2, PATU 8902 spolu s vzorkami (**obrázok č. 25**).



Obrázok č. 25: Analýza formou western blotu s využitím primárnych protilátok viažucich analyzované proteíny.

Detekcia Smad4 pomocou WB bola pôvodným preferovaným postupom, pretože proteín má byť (podľa dát z databáz) vo veľkej miere deletovaný alebo skrátенý. Ukážka WB ale ukazuje prítomnosť proteínu v línii PATU 8902, kde má byť Smad4 deletovaný. U organoidu P45 vidíme možnú zmenu veľkosti proteínu, u všetkých vzoriek prúžok (z angl. „band“) s rovnakou intenzitou.

Naopak u protilátky podľa výrobcu špecificky viažucej proteín p16 nepozorujeme signál u línii MCF7 (odporúčané výrobcom ako negatívna kontrola). Výrazné prúžky sú u HEK-293 a HELA buniek, ktoré tiež výrobca odporúča ako pozitívnu kontrolu. Avšak u ostatných línií bola detegovaná približne rovnaká intenzita signálu, čo neodpovedá predchádzajúcej mutačnej analýze z **tabuľky č. 7**. U vzoriek organoidov je pozorovaný prúžok u organoidu P45.

Detekciu proteínu p53 výrobca zobrazuje na líniách 293-HEK a MCF7. U našich bunkových línií sme signál dostali u HELA, 293-HEK (odpovedá informáciám od výrobcu) a PANC1. U línie MCF7 bol detegovaný slabý signál, podľa výrobcu násobne slabší ako u HEK-293. Prúžok nevzniká u ďalších použitých lyzátov z bunkových kultúr ani u vzoriek organoidov.

Posledným analyzovaným proteínom imunochemicky je K-Ras. Signál sme detegovali u všetkých vzoriek vrátane vzoriek organoidov. Značne zvýšený signál pozorujeme u línie PATU 8902.

6 Diskusia

6.1 In silico analýza

K zacieleniu analýzy genetických alternácií v nádoroch PDAC je potrebné poznať akým zmenám podliehajú genómy buniek týchto nádorov. Spracovaním vyfiltrovaných dát prístupných z genomických databáz sme boli schopní určiť rozloženie mutácií špecificky sa vyskytujúcich v PDAC. Za najčastejšie mutované gény boli určené *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* a *SMAD4*. Vzhľadom na nízku frekvenciu alternácií v ostatných génoch boli k analýze zvolené výhradne vymenované 4 gény. Detailnou analýzou alternácií, ku ktorým dochádza v týchto génoch u PDAC boli odhalené mutačné vzorce vyskytujúce sa opakovanie v PDAC nádoroch. V proto-onkogéne *KRAS* dochádza k bodovým mutáciám v exóne 2 a menej často v exóne 3. Preto sme zvolili sekvenáciu výhradne týchto dvoch exónov ako vhodnú k zachyteniu abnormalít. U TS génu *TP53* je genetické pozadie zložitejšie. Dochádza k deléciám a častým mutáciám. Výskyt bodových mutácií je reportovaný po celom géne. Aj tu je však možné nájsť určitý vzorec a to taký, že najčastejšie je mutovaná oblasť, ktorou sa proteín viaže k DNA, to predstavuje oblasť exónov 5-8 (DBD). *TP53* je mutovaný v menšej časti nádorov (54 %) a dochádza k nim na viacerých častiach génu, takže v porovnaní s *KRAS* je ich detekcia problematickejšia. Ako prístup k ich zachyteniu bola zvolená sekvenácia a nástroj pre analýzu prítomnosti proteínu je metódou WB. U ďalšieho TS génu *SMAD4* nachádzame tiež komplexný mutačný vzorec. Približne v rovnakom množstve prípadov dochádza k deletovaniu a mutovaniu. Mutácie sú často nonsense (asi 35 % prípadov) a tým vzniká skrátenejší proteín. Za týmto zámerom bola navrhnutá detekcia s pomocou WB, kde vieme odhaliť prítomnosť proteínu a tiež jeho veľkosť. Následne sme podľa dát v databázach vyhledali hotspot miesta bodových mutácií a k ich detekcii vybrali sekvenáciu exónov 3, 9, a 12. Posledným TS génom je *CDKN2A*, u ktorého delécia prevažuje nad bodovými mutáciami. Preto bola zvolená analýza WB a tiež PCR detekcia exónov 2 a 3. Podobné výsledky sme dostali analýzou troch rôznych databáz. Zistené skutočnosti z genomických dát boli overené ďalej aj v dostupnej literatúre, kde bolo taktiež zistené, že je možné detegovať varianty v kultúrach organoidov (Seino et al., 2018; Tiriac et al., 2018; Waddell et al., 2015). Odhalením najviac frekventovaných alternácií v PDAC a navrhnutím spôsobu ich detekcie bolo možné postúpiť k zavedeniu metód ich detekcie.

K analýze neboli vybrané gény, *GNAS* a *DNM1P47*, aj keď ich jednotlivé mutácie sme objavili s frekvenciou 1,21 % (*GNAS* mutácia p.R844H) a 3,03 % (*DNM1P47* nekódujúci

transkript). Tieto oblasti neboli vybrané v prvotnom odhade, keďže frekvencia alternácií v týchto génoch je nízka (menej ako 5 %).

Zvolený postup vyhľadávania alternácií bol dôležitý pre pochopenie genetických udalostí v PDAC a navrhnutiu spôsobu ich možnej analýzy. Analýza veľkého množstva dát zhromaždených v databázach umožňuje v relatívne krátkom čase získať detailné informácie. Zvoleným prístupom však získavame len údaje genomické, nevieme analyzovať expresné profily. Taktiež dáta boli analyzované iba metódami dostupnými na serveroch, bez použitia pokročilých bioinformatických metód. Tie sú však po použití patričných filtrov vstupných dát k analýze genómov postačujúce (Nicolle et al., 2019).

6.2 Optimalizácie analýzy

Pred samotným testovaním vzoriek bolo nevyhnutné vyskúšať, či navrhnutým postupom je možné detegovať sledované alternácie a zároveň nájsť optimálne podmienky jednotlivých reakcií. Navrhnutý postup analýzy bol preto najprv zavedený a testovaný na bunkových kultúrach. Ich genetické pozadie poznáme taktiež vďaka vyhľadaniu mutácií u daných línií v databáze cBioPortal aby mohli byť experimentálne dosiahnuté skutočnosti následne porovnané s týmito dátami. Po navrhnutí primerov pre vybrané miesta bola testovaná ich špecifita a určovaná optimálna nasadacia teplota a stanovované podmienky reakcií na nemutovanej DNA HEK-293. Navrhnuté produkty pre gény *KRAS*, *TP53* a *SMAD4* vznikali špecificky, vždy jeden prúžok s požadovanou veľkosťou. Primery pre exóny 2 a 3 génu *CDKN2A* ani po zvyšovaní nasadacej teploty nevykazovali špecifický amplikón a preto musel byť navrhnutý nový pár primerov k amplifikácii oboch exónov. S použitím novo navrhnutého páru vznikala nešpecifická zmes produktov PCR, z ktorých nebolo možné odčítať prítomnosť alebo neprítomnosť úseku DNA u analyzovanej vzorky. Reakcia preto musela prebehnúť s upravenou DNA polymerázou Phusion Plus pri podmienkach určených výrobcom, ktorá vykazuje vysokú špecifitu bez potreby určenia špecifickej nasadacej teploty (podľa údajov výrobcu: <https://bit.ly/3AcSoQg>). S touto polymerázou PCR produkt vznikol iba 1 o požadovanej veľkosti. Vďaka tomu bolo možné z opakovaných reakcií odčítať prítomnosť alebo neprítomnosť daných úsekov DNA u bunkových línií.

Následne muselo byť overené, či je možné krátke amplikóny osekvenovať. Predpokladaný postup prečistenia reakcie formou vyrezania špecifického amplikónu z agarózového gélu po prebehnutí delenia pomocou elektroforézy, a jeho následná izolácia

kitom Kit Agarose Gel Extraction Kit nemohol byť využívaný. Obsah týmto spôsobom vyizolovanej DNA (4-10 ng/ μ l v 30 μ l roztoku) bol zďaleka nedostatočný k sekvenačnej reakcii. Prípravu PCR reakcie v takom objeme, aby bol pri stratách počas izolácie výťažok dostatočný pre sekvenáciu nebolo možné realizovať z hľadiska potreby príliš veľkého vstupného množstva DNA. Preto muselo byť pristúpené k nešpecifickému odstráneniu interferujúcich látok od DNA, ktoré by neumožňovali čitateľnosť sekvenačnej reakcie. Týmto postupom mohlo dôjsť k zníženiu čitateľnosti a citlivosti detekcie, ktorá bola určená na 25 %, v závislosti na pozadí a čitateľnosti sekvenogramu. Podľa štúdie (Tsiatis et al., 2010) je limit pre detekciu pomocou Sangerovej sekvenácie 15-20 % mutovanej formy v géne *KRAS*, exónu 2. Nižšia hranica detekcie v našich podmienkach môže byť spôsobená aj použitými analyzátorom.

Osekvenované úseky museli byť ďalej analyzované. Sekvenogramy obdržané z bunkových línií odpovedali počiatočným predpokladom, t.j. bez vysokého pozadia, čitateľné približne po 40-50 počiatočných bp sekvenogramu. Vzorka však predstavovala zmes homogénnu, teda DNA jednej bunkovej línie. Niektoré sekvenácie neboli čitateľné hneď po prvej sekvenácii, preto boli pripravované opakovane. K analýze postačoval alignment v online nástroji SIM alignment. Detegované alternácie u použitých bunkových línií sa zhodovali s dátami získanými z databáze cBioPortal. Avšak u génu *SMAD4* u línie PATU 8902 pozorujeme prítomnosť PCR produktu, ktorého sekvenácia ukázala formu wt. Tento fakt sa nezhoduje s údajmi získanými z databáze cBioPortal, nakoľko jej dáta udávajú homozygotnú deléciu tohto génu u línie PATU 8902.

Spôsob zvolenej analýzy bol taktiež overený v dostupnej literatúre (Aichler et al., 2012; Rechsteiner et al., 2013; Shah et al., 2017; Stewart et al., 1998; Tsiatis et al., 2010; Wang et al., 2019). Nami navrhnutou analýzou sme schopní analyzovať len vybrané oblasti zvolených génov, ktoré sa však vyskytujú v PDAC najfrekvencovanejšie.

6.3 Alternácie u vzoriek *ex-vivo* kultúr organoidov

Navrhnutý postup po prebehnutí všetkých krokov optimalizácie bolo možné použiť pre analýzy vzoriek organoidov. Vyizolovaná DNA z organoidov predstavovala kvalitnú genomovú DNA, avšak v obmedzenom množstve, ktoré však postačovalo k analýze. Vzorky PDAC z resekovaných tkanív pacientov boli vždy z obdobia, kedy bolo ochorenie u pacienta v štádiu I, v tomto štádiu nie sú u pacientov prítomné metastázy (Peng et al., 2019).

V proto-onkogéne *KRAS* boli vyhľadávané bodové mutácie na troch miestach. Postup bol preto jednoduchý a určenie alternácií, aj vďaka nízkemu pozadiu, jednoznačné. V organoidoch P45 a P58 je jasne viditeľná bodová mutácia v časti vzorky, konkrétne u vzorky P45 mutácia p.G12R a vo vzorke P58 mutácia p.G12V. U organoidu P57 nebola pozorovaná žiadna zámena, sekvencia odpovedá wt sekvencii. Je možné, že u tohto nádoru bola počiatočná mutácia odlišná od *KRAS* (napríklad v géne *BRAF* alebo *GNAS* (Kanda et al., 2012)), na ktorú naša analýza nebola zameraná z dôvodu nízkej frekvencie výskytu (*GNAS* približne v 3 %, *BRAF* približne v 1,8 % (podľa dát získaných z TCGA databáze)). Tiež je možné, že obsah mutovaných alel bol nižší ako 25 %, čo predstavuje hranicu pri ktorej je naša analýza schopná variantu odhaliť. Keďže alternácie v tomto géne sa vyskytujú u takmer všetkých PDAC nádorov (Seino et al., 2018; Tiriác et al., 2018), preto bola očakávaná frekvencia výskytu.

Detekcia alternácií u TS génu *TP53* vyžaduje komplexnejší prístup. Analýza v genomických databázach ukázala, že v ňom u PDAC nádorov, na rozdiel od *KRAS*, dochádza k alternáciám nie len charakteru bodových mutácií. Sekvenácie vybraných exónov u našich vzoriek neboli niektoré čitateľné vôbec (amplikóny exónu 7 u vzorky P57 a exónu 8 u vzoriek P45 a P58) a ďalšie až po približne prvých 100 bp sekvenogramu, čím sme stratili informácie o začiatkoch analyzovaných oblastí. Aj napriek vysokému pozadiu v niektorých častiach sekvencie bolo možné manuálne odčítať niektoré bodové mutácie, ktoré sú zobrazené v **tabuľkách č. 9 A-C**. Použitý spôsob analýzy je vhodný len pri zameraní sa na určené hotspots. *Z in silico* analýz sme sa dozvedeli, že v tejto oblasti dochádza aj k možným inzerciam či deléciam, ktoré môžu tiež znížiť prehľadnosť a spôsobovať nečitateľnosť sekvenogramov. Vzhľadom na nečitateľnosť počiatkov sekvenogramov aj po opakovaní reakcií by som zvažovala zopakovať sekvenovanie s pomocou „reverse“ primeru.

Ďalším analyzovaným TS génom je *SMAD4*. Zvolená forma PCR analýzy hotspot mutácií v exónoch 3, 9 a 12 bola iba doplnok k WB. Týmto spôsobom sú analyzované mutácie sprevádzané, rovnako ako u analýz *TP53* génu, vysokým pozadím a viacerými alternáciami. Detegované alternácie sú zhrnuté v **tabuľke č. 10**. Vzhľadom na nečitateľnosť začiatku niektorých sekvenogramov aj po opakovaní, by som zvažovala sekvenovanie zopakovať s využitím „reverse“ primerov.

U posledného z analyzovaných génov, TS gén *CDKN2A*, neboli, na rozdiel od predošlých génov, odosielané amplikóny PCR na sekvenáciu. Opakovaním PCR reakcie bolo však určené, v ktorých vzorkách táto časť genómu prítomná je a kde nie. Avšak vzhľadom na nespoľahlivosť

detekcie WB by bolo vhodné zaviesť sekvenovať vybrané amplikónov. Neprítomnosť bandov pri PCR však znamená pravdepodobnú deléciu génu u organoidu P45.

Čitateľnosť sekvenogramov mala svoje úskalia. Nie všetky obdržané sekvenogramy bolo jednoznačne možné analyzovať. V prípade nečitateľnej zmesi peakov bola reakcia pripravená v dvojnásobnom objeme a maximálne 2× opakovaná. Ak výsledok sekvenácie niektorého z produktov viedol opakovane k sekvenogramu s nemožnosťou odčítať sekvenciu, bol vyradený z analýzy (exón 7 u vzorky P57 a exón 8 u vzoriek P45 a P58). Niektoré reakcie vykazovali vysokú mieru pozadia, hlavne v prvých približne 100 bp sekvenogramu. Tieto nečitateľnosti mohli byť spôsobené tým, že vzorky organoidov pravdepodobne predstavujú nehomogénnu zmes buniek, kde s určitou frekvenciou sú prítomne aj bunky fibroblastov či imunitné bunky, alebo subpopulácie nádorových buniek (Peng et al., 2019; Yachida et al., 2010). Môže tiež dochádzať k všeobecnému problému u Sangerovej metódy sekvenovania u niektorých krátkych templátov, kedy sekvenačný softvér vyhodnocuje presnejšie dlhšie úseky ako kratšie. Taktiež u analyzovaných TS génov sa s určitou frekvenciou môže vyskytnúť vložená prípadne chýbajúca báza, čo sa na čitateľnosti výsledného sekvenogramu tiež odrazí (vzniknú prekrývajúce sa sekvencie). Presnosti počiatočnej sekvencie by prospelo presekvenovanie aj spätným primerom. U génu *TP53* bude z hľadiska veľkého množstva bodových zmien u väčšieho množstva analyzovaných vzoriek výhodnejšie zameriavať sa výhradne na oblasti popísaných hotspot miest s vysokou prítomnosťou variant a tie dôkladne manuálne zanalyzovať.

Z optimalizácie na bunkových líniách bolo predpokladané, že bude postačovať analýza alignmentom a manuálne spracovanie sekvencie. Avšak u vzoriek organoidov tieto sekvenogramy sa často prekrývajú. Preto navrhujem k ďalším analýzám a re-analýze použiť softvér Mutation Surveyor Software v5.1.2, ktorý je schopný odhaliť a zanalyzovať aj posuny čítacieho rámca spôsobené vloženími či odstránením báz (Raimondi et al., 2020). Jeho využitie by malo prispieť k zjednodušeniu a zlepšeniu presnosti analýzy a tiež k odhaleniu ďalších variant.

Detekcia expresných profilov analyzovaných génov pomocou označenia špecifickou protilátkou bola zisťovaná prítomnosti či neprítomnosti proteínu a jeho prípadná zmena veľkosti. U *Smad4* a *p16* často dochádza k delícii proteínu, prípadne u *CDKN2A* k metylácii promotora (Attri et al., 2005) čím je umlčaná expresia, proteín nevzniká. Preto aj prítomnosť génu (potvrdenie pomocou PCR) nemusí znamenať, že proteín je v bunke prítomný.

U protilátky viažucej Smad4 sme detegovali signál aj u bunkových línií, u ktorých je podľa databáz deletovaný, ale analýzou PCR bola oblasť génu *SMAD4* amplifikovaná a osekvenovaná ako wt forma (u bunkovej línie PATU 8902). Za predpokladu, že protilátka funguje u lyzátu P45 pozorujeme band nachádzajúci sa o niečo nižšie ako u kontrol, preto tam prítomný proteín Smad4 považujeme za skráteneý. Nonsense mutácia sa nachádza pravdepodobne na inom exóne ako sme osekvenovali, prípadne dochádza k inej alternácii, ktorú sme sekvenáciou nezachytili.

S použitím protilátky označujúcej proteín p16 detegujeme signál v línií vzorky organoidu P45. U tohto organoidu nebola pomocou PCR opakovane amplifikovaná sledovaná oblasť génu *CDKN2A* kódujúceho p16 proteín a jeho exón 2 a 3. Je možné, že nasadeniu primerov zabránili mutácie v oblasti ich nasadenia. U ďalších vzoriek organoidov (P57 a P58) nebol pozorovaný žiadny signál. Z toho usudzujeme, že sa proteín v bunke nenachádza.

U použitia protilátky proti proteínu p53 u bunkovej línie MCF7 pozorujeme len slabý band, podľa výrobcu má byť detekovateľný ale o polovicu menej ako u HEK-293. U ďalších lyzátoch bunčných línií a vzoriek organoidov signál nevzniká. V normálnom tkanive proteín p53 je prítomný len v malej miere. Jeho mutovaná forma vykazuje vyššiu stabilitu, tzn. jeho možnú detekciu (Jeong et al., 2005; Milicevic et al., 2014). Neprítomnosť signálu môže znamenať aj úplnú neprítomnosť proteínu. Taktiež je možné analýzu spresniť o detekciu skráteneých proteínov pomocou nukleárnej extrakcia a následného WB (Jeong et al., 2005; Milicevic et al., 2014).

Signál získaný pomocou protilátky K-Ras je prítomný vo všetkých vzorkách organoidov.

Pre detekciu p16 a Smad4 proteínov boli využité aj ďalšie primárne protilátky (p16 (p16 INK4A (D7C1M) Rabbit mAb, Cell Signaling), Smad4 (Smad4 (D3M6U) Rabbit mAb, Cell Signaling)). Tieto primárne protilátky však nevykazovali dostatočnú spoľahlivosť detekcie signálu.

V práci som hľadala optimálny spôsob detekcie najčastejšie sa vyskytujúcich alternácií v PDAC, ktorým je možné analyzovať heterogénnu zmes buniek pestovaných formou organoidov. V prípade génu *KRAS* je dostačujúce použiť metódu Sangerovej sekvenácie exónov 2 a 3. Pre analýzu génov *TP53* a *SMAD4* použitý postup bude doplnený o sekvenovanie spätným primerom, keďže analýza formou WB bola vyhodnotená ako nevhodná, rovnako tak aj u *CDKN2A* génu, u ktorého bude analýza doplnená o sekvenovanie jednotlivých exónov.

Všetky dáta získané sekvenáciou budú analyzované a re-analyzované softvérom Mutation Surveyor Software v5.1.2 pre zlepšenie možnosti detekcie.

7 Súhrn

Za vznikom nádorového ochorenia stojí hromadenie genetických mutácií v bunkách. Neexistuje presná definícia a sekvencia mutácií, ktorých hromadením v bunkách pankreasu vznikne PDAC. Je však možné s pomocou veľkého množstva vzoriek empiricky určiť gény, v ktorých s tieto alternácie môžeme očakávať. Množstvo genomických dát získaných z PDAC vyskytujúcich sa u pacientov po celom svete sú uložené v dostupných webových databázach. Práve detailnou analýzou týchto dát boli k cielenej analýze vybraný gén *KRAS*, proto-onkogén, mutovaný takmer vo všetkých PDAC bunkách, ďalej TS gény *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*. Následne bolo analýzou najčastejších alternácií určená metóda ich analýzy a to WB (pre všetky) a sekvenovanie vybraných exónov daných génov. V prípade génu *CDKN2A* išlo len o detekciu prítomnosti úsekov DNA pomocou PCR.

Podrobne navrhnutý postup analýzy bol zavedený a optimalizovaný na bunkových kultúrach (prevažne pankreatické nádorové línie), ktorých genetické pozadie bolo dohľadané taktiež v genomických databázach s ktorými boli výsledky porovnávané. Vďaka tomu boli získané pozitívne kontroly, ktoré ďalej boli používané pri samotnej analýze vzoriek organoidov. Zavedený protokol bol použitý na vzorky P45, P57 a P58 *ex-vivo* pestovaných resekovaných tkanív PDAC pacientov. Detegované boli bodové mutácie *KRAS* u vzoriek P45 (p.G12R) a P58 (p.G12V) a v génoch *TP53* a *SMAD4*, avšak nie všetky vybrané úseky bolo možné analyzovať. Ďalej bola určená možná delécia génu *CDKN2A* u vzorky P45. Analýza WB sa ukázala ako nespoľahlivá aj s použitím dvoch rôznych protilátok.

Určený postup s navrhnutými zlepšeniami pre zvýšenú presnosť je možné použiť k analýze ďalších vzoriek. Analýza umožňuje detekciu hotspot mutácií génov *KRAS*, *TP53* a *SMAD4* a detekciu prítomnosti génu *CDKN2A* u heterogénnej skupiny buniek pestovanej v 3D kultúrach.

8 Použitá literatúra

- Aguirre, A.J., 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17, 3112–3126.
- Agustsson, T., Wikrantz, P., Rydén, M., Brismar, T., Isaksson, B., 2012. Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia. *Nutrition* 28, 851–855.
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P.K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D.K., Langer, P., Chiblak, S., Dürr, A., Höfler, H., Klöppel, G., Müller-Decker, K., Brielmeier, M., Esposito, I., 2012. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J. Pathol.* 226, 723–734.
- Alexandrova, E.M., Mirza, S.A., Xu, S., Schulz-Heddergott, R., Marchenko, N.D., Moll, U.M., 2017. p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo. *Cell Death Dis.* 8, e2661–e2661.
- Andrysik, Z., Galbraith, M.D., Guarnieri, A.L., Zaccara, S., Sullivan, K.D., Pandey, A., MacBeth, M., Inga, A., Espinosa, J.M., 2017. Identification of a core TP53 transcriptional program with highly distributed tumor suppressive activity. *Genome Res.* 27, 1645–1657.
- Attri, J., Srinivasan, R., Majumdar, S., Radotra, B.D., Wig, J., 2005. Alterations of tumor suppressor gene p16 INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol.* 5, 22–27.
- Babic, A., Schnure, N., Neupane, N.P., Zaman, M.M., Rifai, N., Welch, M.W., Brais, L.K., Rubinson, D.A., Morales-Oyarvide, V., Yuan, C., Zhang, S., Poole, E.M., Wolpin, B.M., Kulke, M.H., Barbie, D.A., Wong, K., Fuchs, C.S., Ng, K., 2018. Plasma inflammatory cytokines and survival of pancreatic cancer patients. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 9, e145–e154.
- Bachmann, J., Büchler, M.W., Friess, H., Martignoni, M.E., 2013. Cachexia in Patients with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer: Impact on Survival and Outcome. *Nutr. Cancer* 65, 827–833.
- Bachmann, J., Heiligensetzer, M., Krakowski-Roosen, H., Büchler, M.W., Friess, H., Martignoni, M.E., 2008. Cachexia Worsens Prognosis in Patients with Resectable Pancreatic Cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 12, 1193–1201.
- Bachmann, J., Ketterer, K., Marsch, C., Fechtner, K., Krakowski-Roosen, H., Büchler, M.W., Friess, H., Martignoni, M.E., 2009. Pancreatic cancer-related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer* 9, 255–264.
- Bardeesy, N., Cheng, K.-h., Berger, J.H., Chu, G.C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A.F., Horner, J., Lauwers, G.Y., Hanahan, D., DePinho, R.A., 2006. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 20, 3130–3146.
- Bardeesy, N., DePinho, R.A., 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* 2, 897–909.
- Barret, M., Antoun, S., Dalban, C., Malka, D., Mansourbakht, T., Zaanani, A., Latko, E., Taieb, J., 2014. Sarcopenia Is Linked to Treatment Toxicity in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Nutr. Cancer* 66, 583–589.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M.F., Monahan, J.E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., Mapa, F.A., Thibault, J., Bric-Furlong, E., Raman, P., Shipway, A., Engels, I.H., Cheng, J., Yu, G.K., Yu, J., Aspesi, P., de Silva, M., Jagtap, K., Jones, M.D., Wang, L., Hatton, C., Palesscandolo, E., Gupta, S., Mahan, S., Sougnez, C., Onofrio, R.C., Liefeld, T., MacConaill, L., Winckler, W., Reich, M., Li, N., Mesirov, J.P., Gabriel, S.B., Getz, G., Ardlie, K., Chan, V., Myer, V.E., Weber, B.L., Porter, J., Warmuth, M., Finan, P., Harris, J.L., Meyerson, M., Golub, T.R., Morrissey, M.P., Sellers, W.R., Schlegel, R., Garraway, L.A., 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607.
- Blackford, A., Serrano, O.K., Wolfgang, C.L., Parmigiani, G., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Eshleman, J.R., Goggins, M., Jaffee, E.M., Iacobuzio-Donahue, C.A., Maitra, A., Cameron, J.L., Olino, K., Schulick, R., Winter, J., Herman, J.M., Laheru, D., Klein, A.P., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Hruban, R.H., 2009. SMAD4 Gene Mutations Are Associated with Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 4674–4679.

- Boj, S.F., Hwang, C.-I., Baker, L.A., Chio, I.I.C., Engle, D.D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M.S., Gracanin, A., Oni, T., Yu, K.H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K.D., Wilson, J.P., Feigin, M.E., Öhlund, D., Handly-Santana, A., Ardito-Abraham, C.M., Ludwig, M., Elyada, E., Alagesan, B., Biffi, G., Yordanov, G.N., Delcuze, B., Creighton, B., Wright, K., Park, Y., Morsink, F.H.M., Molenaar, I.Q., Borel Rinkes, I.H., Cuppen, E., Hao, Y., Jin, Y., Nijman, I.J., Iacobuzio-Donahue, C., Leach, S.D., Pappin, D.J., Hammell, M., Klimstra, D.S., Basturk, O., Hruban, R.H., Offerhaus, G.J., Vries, R.G.J., Clevers, H., Tuveson, D.A., 2015. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell* 160, 324–338.
- Bonetto, A., Aydogdu, T., Jin, X., Zhang, Z., Zhan, R., Puzis, L., Koniaris, L.G., Zimmers, T.A., 2012. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Metab.* 303, E410–E421.
- Bonetto, A., Aydogdu, T., Kunzevitzky, N., Guttridge, D.C., Khuri, S., Koniaris, L.G., Zimmers, T.A., 2011. STAT3 Activation in Skeletal Muscle Links Muscle Wasting and the Acute Phase Response in Cancer Cachexia. *PLoS One* 6, e22538.
- Bourdon, C., Fernandes, K., Murraz-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D., Savile, M., Lane, D., 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–2137.
- Brady, C.A., Attardi, L.D., 2010. p53 at a glance. *J. Cell Sci.*
- Braganza, J.M., Lee, S.H., McCloy, R.F., McMahon, M.J., 2011. Chronic pancreatitis. *Lancet* 377, 1184–1197.
- Budipitojo, T., Fibrianto, Y.H., Mulyani, G.T., 2016. The types of endocrine cells in the pancreas of Sunda porcupine (*Hystrix javanica*). *Vet. World* 9, 563–567.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J., 2003. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625–1638.
- Capurso, G., Sette, C., 2019. Drug resistance in pancreatic cancer: New player caught in act. *EBioMedicine* 40, 39–40.
- Carrer, A., Trefely, S., Zhao, S., Campbell, S.L., Norgard, R.J., Schultz, K.C., Sidoli, S., Parris, J.L.D., Affronti, H.C., Sivanand, S., Egolf, S., Sela, Y., Trizzino, M., Gardini, A., Garcia, B.A., Snyder, N.W., Stanger, B.Z., Wellen, K.E., 2019. Acetyl-CoA Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov.* 9, 416–435.
- Chang, M.T., Asthana, S., Gao, S.P., Lee, B.H., Chapman, J.S., Kandoth, C., Gao, J., Socci, N.D., Solit, D.B., Olshen, A.B., Schultz, N., Taylor, B.S., 2016. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat. Biotechnol.* 34, 155–163.
- Chipuk, J.E., 2004. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* (80-). 303, 1010–1014.
- Choi, C.C., Choi, J., Houli, N., Smith, M., Usatoff, V., Lipton, L., Chan, S., 2021. Evaluation of palliative treatments in unresectable pancreatic cancer. *ANZ J. Surg.* 91, 915–920.
- Chuvin, N., Vincent, D.F., Pommier, R.M., Alcaraz, L.B., Gout, J., Caligaris, C., Yacoub, K., Cardot, V., Roger, E., Kaniewski, B., Martel, S., Cintas, C., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Valantin, J., Gadot, N., Servoz, E., Morton, J., Goddard, I., Couvelard, A., Rebours, V., Guillermet, J., Sansom, O.J., Treilleux, I., Valcourt, U., Sentis, S., Dubus, P., Bartholin, L., 2017. Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRAS G12D -driven Pancreatic Tumorigenesis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 263–282.
- Cicenas, J., Kvederaviciute, K., Meskinyte, I., Meskinyte-Kausiliene, E., Skeberdyte, A., Cicenas, J., 2017. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 9, 42–51.
- Collins, M.A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J.-C., Galbán, S., Galbán, C.J., Rakshit, S., Flannagan, K.S., Adsay, N.V., Pasca di Magliano, M., 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 639–653.
- Collisson, E.A., Trejo, C.L., Silva, J.M., Gu, S., Korkola, J.E., Heiser, L.M., Charles, R.-P., Rabinovich, B.A., Hann, B., Dankort, D., Spellman, P.T., Phillips, W.A., Gray, J.W., McMahon, M., 2012. A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2, 685–693.

- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., 2011. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 364, 1817–1825.
- Cruz, M.S.D.D. La, Young, A.P., Ruffin, M.T., 2014. Diagnosis and Management of Pancreatic Cancer. *Am. Fam. Physician* 89, 626–632.
- Danai, L. V., Babic, A., Rosenthal, M.H., Dennstedt, E.A., Muir, A., Lien, E.C., Mayers, J.R., Tai, K., Lau, A.N., Jones-Sali, P., Prado, C.M., Petersen, G.M., Takahashi, N., Sugimoto, M., Yeh, J.J., Lopez, N., Bardeesy, N., Fernandez-del Castillo, C., Liss, A.S., Koong, A.C., Bui, J., Yuan, C., Welch, M.W., Brais, L.K., Kulke, M.H., Dennis, C., Clish, C.B., Wolpin, B.M., Vander Heiden, M.G., 2018. Altered exocrine function can drive adipose wasting in early pancreatic cancer. *Nature* 558, 600–604.
- Das, S.K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., Gorkiewicz, G., Tamilarasan, K.P., Kumari, P., Trauner, M., Zimmermann, R., Vesely, P., Haemmerle, G., Zechner, R., Hoefler, G., 2011. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia. *Science* (80-). 333, 233–238.
- Davidson, W., Ash, S., Capra, S., Bauer, J., 2004. Weight stabilisation is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer. *Clin. Nutr.* 23, 239–247.
- Delitto, D., Zhang, D., Han, S., Black, B.S., Knowlton, A.E., Vlada, A.C., Sarosi, G.A., Behrns, K.E., Thomas, R.M., Lu, X., Liu, C., George, T.J., Hughes, S.J., Wallet, S.M., Trevino, J.G., 2016. Nicotine Reduces Survival via Augmentation of Paracrine HGF–MET Signaling in the Pancreatic Cancer Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 22, 1787–1799.
- Dewys, W.D., Begg, C., Lavin, P.T., Band, P.R., Bennett, J.M., Bertino, J.R., Cohen, M.H., Douglass, H.O., Engstrom, P.F., Ezzidli, E.Z., Horton, J., Johnson, G.J., Moertel, C.G., Oken, M.M., Perlia, C., Rosenbaum, C., Silverstein, M.N., Skeel, R.T., Sponzo, R.W., Tormey, D.C., 1980. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *Am. J. Med.* 69, 491–497.
- Dey, P., Baddour, J., Muller, F., Wu, C.C., Wang, H., Liao, W.-T., Lan, Z., Chen, A., Gutschner, T., Kang, Y., Fleming, J., Satani, N., Zhao, D., Achreja, A., Yang, L., Lee, J., Chang, E., Genovese, G., Viale, A., Ying, H., Draetta, G., Maitra, A., Wang, Y.A., Nagrath, D., DePinho, R.A., 2017. Genomic deletion of malic enzyme 2 confers collateral lethality in pancreatic cancer. *Nature* 542, 119–123.
- Di Marco, M., Astolfi, A., Grassi, E., 2015. Characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma using whole transcriptome sequencing and copy number analysis by single-nucleotide polymorphism array. *Mol. Med. Rep.* 12, 7479–7484.
- Díte, P., Starý, K., Novotný, I., Přechtelová, M., Dolina, J., Lata, J., Zbořil, V., 2001. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 749–750.
- Donglai, L., Shi-cang, Y., Yi-fang, P., 2016. A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics. *Oncotarget* 7, 56904–56914.
- Doyle, A., Kubler, M.M., Harris, A.C., López, A., Govindaraj, P., Prins, P., Weinberg, B.A., 2019. The impact of CDKN2A mutations on overall survival in pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 37, 278–278.
- Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W.F., Courtois, E.T., Burkhart, R.A., Teinor, J.A., Belleau, P., Biffi, G., Lucito, M.S., Sivajothi, S., Armstrong, T.D., Engle, D.D., Yu, K.H., Hao, Y., Wolfgang, C.L., Park, Y., Preall, J., Jaffee, E.M., Califano, A., Robson, P., Tuveson, D.A., 2019. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov.* 9, 1102–1123.
- Escobar-Hoyos, L.F., Penson, A., Kannan, R., Cho, H., Pan, C.-H., Singh, R.K., Apken, L.H., Hobbs, G.A., Luo, R., Lecomte, N., Babu, S., Pan, F.C., Alonso-Curbelo, D., Morris, J.P., Askan, G., Grbovic-Huezo, O., Ogrodowski, P., Bermeo, J., Saglimbeni, J., Cruz, C.D., Ho, Y.-J., Lawrence, S.A., Melchor, J.P., Goda, G.A., Bai, K., Pastore, A., Hogg, S.J., Raghavan, S., Bailey, P., Chang, D.K., Biankin, A., Shroyer, K.R., Wolpin, B.M., Aguirre, A.J., Ventura, A., Taylor, B., Der, C.J., Dominguez, D., Kümmel, D., Oeckinghaus, A., Lowe, S.W., Bradley, R.K., Abdel-Wahab, O., Leach, S.D., 2020. Altered RNA Splicing by Mutant p53 Activates Oncogenic RAS Signaling in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 38, 198–211.e8.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., Saur, D., 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*

111, 817–822.

- Fearon, K., Strasser, F., Anker, S.D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R.L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S., Baracos, V.E., 2011. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 12, 489–495.
- Ferlay, J., Partensky, C., Bray, F., 2016. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol. (Madr).* 55, 1158–1160.
- Fischer, M., 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 36, 3943–3956.
- Frank, A.K., Pietsch, E.C., Dumont, P., Tao, J., Murphy, M.E., 2011. Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. *Cancer Biol. Ther.* 11, 740–745.
- Gaglio, D., Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Hiller, K., Danna, L.S., Balestrieri, C., Alberghina, L., Stephanopoulos, G., Chiaradonna, F., 2011. Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol. Syst. Biol.* 7, 523–530.
- Gao, J., Chang, M.T., Johnsen, H.C., Gao, S.P., Sylvester, B.E., Sumer, S.O., Zhang, H., Solit, D.B., Taylor, B.S., Schultz, N., Sander, C., 2017. 3D clusters of somatic mutations in cancer reveal numerous rare mutations as functional targets. *Genome Med.* 9, 4.
- Gapstur, S.M., Jacobs, E.J., Deka, A., McCullough, M.L., Patel, A. V., Thun, M.J., 2011. Association of Alcohol Intake With Pancreatic Cancer Mortality in Never Smokers. *Arch. Intern. Med.* 171, 444–451.
- Ghaleb, A., Padellan, M., Marchenko, N., 2020. Mutant p53 drives the loss of heterozygosity by the upregulation of Nek2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 22, 133.
- Ghandi, M., Huang, F.W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G. V., Lo, C.C., McDonald, E.R., Barretina, J., Gelfand, E.T., Bielski, C.M., Li, H., Hu, K., Andreev-Drakhlin, A.Y., Kim, J., Hess, J.M., Haas, B.J., Aguet, F., Weir, B.A., Rothberg, M. V., Paolella, B.R., Lawrence, M.S., Akbani, R., Lu, Y., Tiv, H.L., Gokhale, P.C., de Weck, A., Mansour, A.A., Oh, C., Shih, J., Hadi, K., Rosen, Y., Bistline, J., Venkatesan, K., Reddy, A., Sonkin, D., Liu, M., Lehar, J., Korn, J.M., Porter, D.A., Jones, M.D., Golji, J., Caponigro, G., Taylor, J.E., Dunning, C.M., Creech, A.L., Warren, A.C., McFarland, J.M., Zamanighomi, M., Kauffmann, A., Stransky, N., Imielinski, M., Maruvka, Y.E., Cherniack, A.D., Tsherniak, A., Vazquez, F., Jaffe, J.D., Lane, A.A., Weinstock, D.M., Johannessen, C.M., Morrissey, M.P., Stegmeier, F., Schlegel, R., Hahn, W.C., Getz, G., Mills, G.B., Boehm, J.S., Golub, T.R., Garraway, L.A., Sellers, W.R., 2019. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569, 503–508.
- Gonzalez, D.M., Medici, D., 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7, re8–re8.
- Grau, A.M., Zhang, L., Wang, W., Ruan, S., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Zhang, W., Chiao, P.J., 1997. Induction of p21waf1 Expression and Growth Inhibition by Transforming Growth Factor β Involve the Tumor Suppressor Gene DPC4 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res.* 57.
- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., Barbacid, M., 2007. Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* 11, 291–302.
- Haeno, H., Gonen, M., Davis, M.B., Herman, J.M., Iacobuzio-Donahue, C.A., Michor, F., 2012. Computational Modeling of Pancreatic Cancer Reveals Kinetics of Metastasis Suggesting Optimum Treatment Strategies. *Cell* 148, 362–375.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hassan, M.M., Bondy, M.L., Wolff, R.A., Abbruzzese, J.L., Vauthey, J.-N., Pisters, P.W., Evans, D.B., Khan, R., Chou, T.-H., Lenzi, R., Jiao, L., Li, D., 2007. Risk Factors for Pancreatic Cancer: Case-Control Study. *Am. J. Gastroenterol.* 102, 2696–2707.
- Hendifar, A.E., Chang, J.I., Huang, B.Z., Tuli, R., Wu, B.U., 2018. Cachexia, and not obesity, prior to pancreatic cancer diagnosis worsens survival and is negated by chemotherapy. *J. Gastrointest. Oncol.* 9, 17–23.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P.,

- Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A., 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.
- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., Tuveson, D.A., 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483.
- Hosoda, W., Chianchiano, P., Griffin, J.F., Pittman, M.E., Brosens, L.A.A., Noë, M., Yu, J., Shindo, K., Suenaga, M., Rezaee, N., Yonescu, R., Ning, Y., Albores-Saavedra, J., Yoshizawa, N., Harada, K., Yoshizawa, A., Hanada, K., Yonehara, S., Shimizu, M., Uehara, T., Samra, J.S., Gill, A.J., Wolfgang, C.L., Goggins, M.G., Hruban, R.H., Wood, L.D., 2017. Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J. Pathol.* 242, 16–23.
- Hruban, R.H., Maitra, A., Goggins, M., 2008. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 1, 306–16.
- Hruban, R.H., Wilentz, R.E., Kern, S.E., 2000. Genetic Progression in the Pancreatic Ducts. *Am. J. Pathol.* 156, 1821–1825.
- Huang, H., Daniluk, J., Liu, Y., Chu, J., Li, Z., Ji, B., Logsdon, C.D., 2014. Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity. *Oncogene* 33, 532–535.
- Humpton, T.J., Hock, A.K., Maddocks, O.D.K., Vousden, K.H., 2018. p53-mediated adaptation to serine starvation is retained by a common tumour-derived mutant. *Cancer Metab.* 6, 18.
- Hustinx, S.R., Leoni, L.M., Yeo, C.J., Brown, P.N., Goggins, M., Kern, S.E., Hruban, R.H., Maitra, A., 2005. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod. Pathol.* 18, 959–963.
- Ibrahim, I., Sibinga Mulder, B.G., Bonsing, B., Morreau, H., Farina Sarasqueta, A., Inderson, A., Luelmo, S., Feshtali, S., Potjer, T.P., de Vos tot Nederveen Cappel, W., Wasser, M., Vasen, H.F.A., 2018. Risk of multiple pancreatic cancers in CDKN2A-p16-Leiden mutation carriers. *Eur. J. Hum. Genet.* 26, 1227–1229.
- Ischenko, I., D’Amico, S., Rao, M., Li, J., Hayman, M.J., Powers, S., Petrenko, O., Reich, N.C., 2021. KRAS drives immune evasion in a genetic model of pancreatic cancer. *Nat. Commun.* 12, 1482.
- Jeong, J., Park, Y.N., Park, J.S., Yoon, D.-S., Chi, H.S., Kim, B.R., 2005. Clinical Significance of p16 Protein Expression Loss and Aberrant p53 Protein Expression in Pancreatic Cancer. *Yonsei Med. J.* 46, 519.
- Judge, S.M., Nosacka, R.L., Delitto, D., Gerber, M.H., Cameron, M.E., Trevino, J.G., Judge, A.R., 2018. Skeletal Muscle Fibrosis in Pancreatic Cancer Patients with Respect to Survival. *JNCI Cancer Spectr.* 2.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M., 2012. Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730-733.e9.
- Katz, M.H.G., Wang, H., Fleming, J.B., Sun, C.C., Hwang, R.F., Wolff, R.A., Varadhachary, G., Abbruzzese, J.L., Crane, C.H., Krishnan, S., Vauthey, J.-N., Abdalla, E.K., Lee, J.E., Pisters, P.W.T., Evans, D.B., 2009. Long-Term Survival After Multidisciplinary Management of Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 836.
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., Hara, M., 2009. Islet architecture: A comparative study. *Islets* 1, 129–136.
- Klein, W.M., Hruban, R.H., Klein-Szanto, A.J.P., Wilentz, R.E., 2002. Direct Correlation between Proliferative Activity and Dysplasia in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN): Additional Evidence for a Recently Proposed Model of Progression. *Mod. Pathol.* 15, 441–447.
- Koong, A.C., Mehta, V.K., Le, Q.T., Fisher, G.A., Terris, D.J., Brown, J.M., Bastidas, A.J., Vierra, M., 2000. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol.* 48, 919–922.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaeffer, D.F., Samani, A., Taghizadeh, F., Cowan, R.W., Rhim, A.D., Stiles, B.L., Valasek, M., Sander, M., 2018. Loss of Pten and Activation of Kras Synergistically Induce Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia From Pancreatic Ductal Cells in Mice. *Gastroenterology* 154, 1509-1523.e5.

- Kopp, J.L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.-F., Dubois, C.L., Morris, J.P., Pan, F.C., Akiyama, H., Wright, C.V.E., Jensen, K., Hebrok, M., Sander, M., 2012. Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22, 737–750.
- Latenstein, A.E.J., van der Geest, L.G.M., Bonsing, B.A., Groot Koerkamp, B., Haj Mohammad, N., de Hingh, I.H.J.T., de Meijer, V.E., Molenaar, I.Q., van Santvoort, H.C., van Tienhoven, G., Verheij, J., Vissers, P.A.J., de Vos-Geelen, J., Busch, O.R., van Eijck, C.H.J., van Laarhoven, H.W.M., Besselink, M.G., Wilmink, J.W., 2020. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* 125, 83–93.
- Lee, K.E., Bar-Sagi, D., 2010. Oncogenic KRas Suppresses Inflammation-Associated Senescence of Pancreatic Ductal Cells. *Cancer Cell* 18, 448–458.
- Liu, J., Akanuma, N., Liu, C., Naji, A., Halff, G.A., Washburn, W.K., Sun, L., Wang, P., 2016. TGF- β 1 promotes acinar to ductal metaplasia of human pancreatic acinar cells. *Sci. Rep.* 6, 30904.
- Logsdon, C.D., Simeone, D.M., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, J.K., Giordano, T.J., Misek, D.E., Kuick, R., Hanash, S., 2003. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 63, 2649–57.
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimagno, E.P., Andren-Sandberg, A., Domellof, L., 1993. Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* 328, 1433–1437.
- Maddalena, M., Mallel, G., Nataraj, N.B., Shreberk-Shaked, M., Hassin, O., Mukherjee, S., Arandkar, S., Rotkopf, R., Kapsack, A., Lambiase, G., Pellegrino, B., Ben-Isaac, E., Golani, O., Addadi, Y., Hajaj, E., Eilam, R., Straussman, R., Yarden, Y., Lotem, M., Oren, M., 2021. TP53 missense mutations in PDAC are associated with enhanced fibrosis and an immunosuppressive microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2025631118.
- Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., Hruban, R.H., 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 12, 81–91.
- Mao, C., 1995. Observations on the Developmental Patterns and the Consequences of Pancreatic Exocrine Adenocarcinoma. *Arch. Surg.* 130, 125.
- McConnell, B.B., Gregory, F.J., Stott, F.J., Hara, E., Peters, G., 1999. Induced Expression of p16 INK4a Inhibits Both CDK4- and CDK2-Associated Kinase Activity by Reassortment of Cyclin-CDK-Inhibitor Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1981–1989.
- Milicevic, Z., Kasapovic, J., Gavrilovic, L., Milovanovic, Z., Bajic, V., Spremo-Potparevic, B., 2014. Mutant p53 protein expression and antioxidant status deficiency in breast cancer. *EXCLI J.* 13, 691–708.
- Mitsunaga, S., Kasamatsu, E., Machii, K., 2020. Incidence and frequency of cancer cachexia during chemotherapy for advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Support. Care Cancer* 28, 5271–5279.
- Morris, J.P., Yashinskii, J.J., Koche, R., Chandwani, R., Tian, S., Chen, C.-C., Baslan, T., Marinkovic, Z.S., Sánchez-Rivera, F.J., Leach, S.D., Carmona-Fontaine, C., Thompson, C.B., Finley, L.W.S., Lowe, S.W., 2019. α -Ketoglutarate links p53 to cell fate during tumour suppression. *Nature* 573, 595–599.
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., Frame, M.C., Evans, T.R.J., Sansom, O.J., 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 246–251.
- Nicolle, R., Raffenne, J., Paradis, V., Couvelard, A., de Reynies, A., Blum, Y., Cros, J., 2019. Prognostic Biomarkers in Pancreatic Cancer: Avoiding Errata When Using the TCGA Dataset. *Cancers (Basel)*. 11, 126.
- Nusinow, D.P., Szpyt, J., Ghandi, M., Rose, C.M., McDonald, E.R., Kalocsay, M., Jané-Valbuena, J., Gelfand, E., Schweppe, D.K., Jedrychowski, M., Golji, J., Porter, D.A., Rejtar, T., Wang, Y.K., Kryukov, G. V., Stegmeier, F., Erickson, B.K., Garraway, L.A., Sellers, W.R., Gygi, S.P., 2020. Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell* 180, 387-402.e16.
- Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A.S., Ponz-Sarvisé, M., Corbo, V., Oni, T.E., Hearn, S.A., Lee, E.J., Chio, I.I.C., Hwang, C.-I., Tiriác, H., Baker, L.A., Engle, D.D., Feig, C., Kultti, A., Egeblad, M.,

- Fearon, D.T., Crawford, J.M., Clevers, H., Park, Y., Tuveson, D.A., 2017. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 214, 579–596.
- Olson, B., Zhu, X., Norgard, M.A., Levasseur, P.R., Butler, J.T., Buenafe, A., Burfeind, K.G., Michaelis, K.A., Pelz, K.R., Mendez, H., Edwards, J., Krasnow, S.M., Grossberg, A.J., Marks, D.L., 2021. Lipocalin 2 mediates appetite suppression during pancreatic cancer cachexia. *Nat. Commun.* 12, 2057.
- Oni, T.E., Biffi, G., Baker, L.A., Hao, Y., Tonelli, C., Somerville, T.D.D., Deschênes, A., Belleau, P., Hwang, C., Sánchez-Rivera, F.J., Cox, H., Brosnan, E., Doshi, A., Lumia, R.P., Khaledi, K., Park, Y., Trotman, L.C., Lowe, S.W., Krasnitz, A., Vakoc, C.R., Tuveson, D.A., 2020. SOAT1 promotes mevalonate pathway dependency in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 217.
- Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., Lauber, K., 2019. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat. Oncol.* 14, 141.
- Ouelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C.J., 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993–1000.
- Pantsar, T., 2020. The current understanding of KRAS protein structure and dynamics. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 189–198.
- Peng, J., Sun, B.-F., Chen, C.-Y., Zhou, J.-Y., Chen, Y.-S., Chen, H., Liu, L., Huang, D., Jiang, J., Cui, G.-S., Yang, Y., Wang, W., Guo, D., Dai, M., Guo, J., Zhang, T., Liao, Q., Liu, Y., Zhao, Y.-L., Han, D.-L., Zhao, Y., Yang, Y.-G., Wu, W., 2019. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res.* 29, 725–738.
- Perera, R.M., Stoykova, S., Nicolay, B.N., Ross, K.N., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, M.K., Ferrone, C.R., Settleman, J., Stephanopoulos, G., Dyson, N.J., Zoncu, R., Ramaswamy, S., Haas, W., Bardeesy, N., 2015. Transcriptional control of autophagy–lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* 524, 361–365.
- Prado, C.M.M., Baracos, V.E., McCargar, L.J., Mourtzakis, M., Mulder, K.E., Reiman, T., Butts, C.A., Scarfe, A.G., Sawyer, M.B., 2007. Body Composition as an Independent Determinant of 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy Toxicity. *Clin. Cancer Res.* 13, 3264–3268.
- Principe, D.R., DeCant, B., Mascariñas, E., Wayne, E.A., Diaz, A.M., Akagi, N., Hwang, R., Pasche, B., Dawson, D.W., Fang, D., Bentrem, D.J., Munshi, H.G., Jung, B., Grippo, P.J., 2016. TGFβ Signaling in the Pancreatic Tumor Microenvironment Promotes Fibrosis and Immune Evasion to Facilitate Tumorigenesis. *Cancer Res.* 76, 2525–2539.
- Rahn, S., Zimmermann, V., Viol, F., Knaack, H., Stemmer, K., Peters, L., Lenk, L., Ungefroren, H., Saur, D., Schäfer, H., Helm, O., Sebens, S., 2018. Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett.* 415, 129–150.
- Raimondi, G., Mato-Berciano, A., Pascual-Sabater, S., Rovira-Rigau, M., Cuatrecasas, M., Fondevila, C., Sánchez-Cabús, S., Begthel, H., Boj, S.F., Clevers, H., Fillat, C., 2020. Patient-derived pancreatic tumour organoids identify therapeutic responses to oncolytic adenoviruses. *EBioMedicine* 56, 102786.
- Rasheed, Z.A., Matsui, W., Maitra, A., 2012. Pathology of pancreatic stroma in PDAC, Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment.
- Rawla, P., Sunkara, T., Gaduputi, V., 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* 10, 10–27.
- Rechsteiner, M., von Teichman, A., Rüschoff, J.H., Fankhauser, N., Pestalozzi, B., Schraml, P., Weber, A., Wild, P., Zimmermann, D., Moch, H., 2013. KRAS, BRAF, and TP53 Deep Sequencing for Colorectal Carcinoma Patient Diagnostics. *J. Mol. Diagnostics* 15, 299–311.
- Reinhold, W.C., Sunshine, M., Liu, H., Varma, S., Kohn, K.W., Morris, J., Doroshow, J., Pommier, Y., 2012. CellMiner: A Web-Based Suite of Genomic and Pharmacologic Tools to Explore Transcript and Drug Patterns in the NCI-60 Cell Line Set. *Cancer Res.* 72, 3499–3511.
- Ren, B., Liu, X., Suriawinata, A.A., 2019. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions. *Am. J.*

- Pathol. 189, 9–21.
- Saha, G., Singh, R., Mandal, A., Das, S., Chattopadhyay, E., Panja, P., Roy, P., DeSarkar, N., Gulati, S., Ghatak, S., Ghosh, Shibajyoti, Banerjee, S., Roy, B., Ghosh, Saurabh, Chaudhuri, D., Arora, N., Biswas, N.K., Sikdar, N., 2020. A novel hotspot and rare somatic mutation p.A138V, at TP53 is associated with poor survival of pancreatic ductal and periampullary adenocarcinoma patients. *Mol. Med.* 26, 59.
- Sahin, I.H., Elias, H., Chou, J.F., Capanu, M., O'Reilly, E.M., 2018. Pancreatic adenocarcinoma: insights into patterns of recurrence and disease behavior. *BMC Cancer* 18, 769.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.
- Scheffzek, K., 1997. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* (80-.). 277, 333–338.
- Seino, T., Kawasaki, S., Shimokawa, M., Tamagawa, H., Toshimitsu, K., Fujii, M., Ohta, Y., Matano, M., Nanki, K., Kawasaki, K., Takahashi, S., Sugimoto, S., Iwasaki, E., Takagi, J., Itoi, T., Kitago, M., Kitagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., 2018. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell* 22, 454-467.e6.
- Sener, S.F., Fremgen, A., Menck, H.R., Winchester, D.P., 1999. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985–1995, using the National Cancer Database11No competing interests declared. *J. Am. Coll. Surg.* 189, 1–7.
- Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D., 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704–707.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W., 1997. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Shah, V., Boyd, K.D., Houlston, R.S., Kaiser, M.F., 2017. Constitutional mutation in CDKN2A is associated with long term survivorship in multiple myeloma: a case report. *BMC Cancer* 17, 718.
- Sharpless, E., Chin, L., 2003. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092–8.
- Shay, J.W., Nichols, M.A., Xiong, Y., 1994. Transcriptional Repression of the D-Type Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16 by the Retinoblastoma Susceptibility Gene Product pRb. *Cancer Res.* 54, 6078–6082.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., Wright, W.E., 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 196, 33–39.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70, 7–30.
- Singh, P., Srinivasan, R., Wig, J.D., 2012. SMAD4 Genetic Alterations Predict a Worse Prognosis in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* 41, 541–546.
- Stewart, R.L., Royds, J.A., Burton, J.L., Heatley, M.K., Wells, M., 1998. Direct sequencing of the p53 gene shows absence of mutations in endometrioid endometrial adenocarcinomas expressing p53 protein. *Histopathology* 33, 440–445.
- Sun, S., Chen, H., Sun, L., Wang, M., Wu, X., Xiao, Z.X.J., 2020. Hotspot mutant p53-R273H inhibits KLF6 expression to promote cell migration and tumor metastasis. *Cell Death Dis.* 11, 595.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249.
- Tang, B., Li, Y., Qi, G., Yuan, S., Wang, Z., Yu, S., Li, B., He, S., 2015. Clinicopathological Significance of CDKN2A Promoter Hypermethylation Frequency with Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* 5, 13563.
- Tascilar, M., Rosty, C., Wilentz, R.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Goggins, M., Skinner, H.G., Sohn, T., Offerhaus, G.J.A., Abrams, R.A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., Adsay, V., 2001. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7, 4115–4121.
- Tiriach, H., Belleau, P., Engle, D.D., Plenker, D., Deschênes, A., Somerville, T.D.D., Froeling, F.E.M., Burkhart, R.A., Denroche, R.E., Jang, G.-H., Miyabayashi, K., Young, C.M., Patel, H., Ma, M., LaComb, J.F., Palmaira, R.L.D.,

- Javed, A.A., Huynh, J.C., Johnson, M., Arora, K., Robine, N., Shah, M., Sanghvi, R., Goetz, A.B., Lowder, C.Y., Martello, L., Driehuis, E., LeComte, N., Askan, G., Iacobuzio-Donahue, C.A., Clevers, H., Wood, L.D., Hruban, R.H., Thompson, E., Aguirre, A.J., Wolpin, B.M., Sasson, A., Kim, J., Wu, M., Bucobo, J.C., Allen, P., Sejjal, D. V., Nealon, W., Sullivan, J.D., Winter, J.M., Gimotty, P.A., Grem, J.L., DiMaio, D.J., Buscaglia, J.M., Grandgenett, P.M., Brody, J.R., Hollingsworth, M.A., O’Kane, G.M., Notta, F., Kim, E., Crawford, J.M., Devoe, C., Ocean, A., Wolfgang, C.L., Yu, K.H., Li, E., Vakoc, C.R., Hubert, B., Fischer, S.E., Wilson, J.M., Moffitt, R., Knox, J., Krasnitz, A., Gallinger, S., Tuveson, D.A., 2018. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 8, 1112–1129.
- Tran, T.Q., Lowman, X.H., Reid, M.A., Mendez-Dorantes, C., Pan, M., Yang, Y., Kong, M., 2017. Tumor-associated mutant p53 promotes cancer cell survival upon glutamine deprivation through p21 induction. *Oncogene* 36, 1991–2001.
- Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., Rich, R.G., Hafez, M.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., Murphy, K.M., 2010. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. *J. Mol. Diagnostics* 12, 425–432.
- Tu, Q., Yang, D., Zhang, X., Jia, X., An, S., Yan, L., Dai, H., Ma, Y., Tang, C., Tong, W., Hou, Z., Lv, L., Tan, J., Zhao, X., 2019. A novel pancreatic cancer model originated from transformation of acinar cells in adult tree shrew, a primate-like animal. *Dis. Model. Mech.* 12.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.
- Van Royen, M., Carbó, N., Busquets, S., Alvarez, B., Quinn, L.S., López-Soriano, F.J., Argilés, J.M., 2000. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 533–537.
- Vousden, K.H., Ryan, K.M., 2009. p53 and metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 9, 691–700.
- Waddell, Nicola, Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M.C.J., Robertson, A.J., Fadlullah, M.Z.H., Bruxner, T.J.C., Christ, A.N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Wani, S., Wilson, P.J., Markham, E., Cloonan, N., Anderson, M.J., Fink, J.L., Holmes, O., Kazakoff, S.H., Leonard, C., Newell, F., Poudel, B., Song, S., Taylor, D., Waddell, Nick, Wood, S., Xu, Q., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Lee, H.C., Jones, M.D., Nagrial, A.M., Humphris, J., Chantrill, L.A., Chin, V., Steinmann, A.M., Mawson, A., Humphrey, E.S., Colvin, E.K., Chou, A., Scarlett, C.J., Pinho, A. V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Pettitt, J.A., Merrett, N.D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Niclou, S.P., Bjerkgvig, R., Grützmänn, R., Aust, D., Hruban, R.H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Falconi, M., Zamboni, G., Tortora, G., Tempero, M.A., Gill, A.J., Eshleman, J.R., Pilarsky, C., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Pearson, J. V., Biankin, A. V., Grimmond, S.M., 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501.
- Wang, Yu, Liang, Y., Xu, H., Zhang, X., Mao, T., Cui, J., Yao, J., Wang, Yongchao, Jiao, F., Xiao, X., Hu, J., Xia, Q., Zhang, X., Wang, X., Sun, Y., Fu, D., Shen, L., Xu, X., Xue, J., Wang, L., 2021. Single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma identifies a novel fibroblast subtype associated with poor prognosis but better immunotherapy response. *Cell Discov.* 7, 36.
- Wang, Z., Li, Y., Zhan, S., Zhang, L., Zhang, S., Tang, Q., Li, M., Tan, Z., Liu, S., Xing, X., 2019. SMAD4 Y353C promotes the progression of PDAC. *BMC Cancer* 19, 1037.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., Chandel, N.S., 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8788–8793.
- Weissmueller, S., Machado, E., Saborowski, M., Morris, J.P., Wagenblast, E., Davis, C.A., Moon, S.-H., Pfister, N.T., Tschaharganeh, D.F., Kitzing, T., Aust, D., Markert, E.K., Wu, J., Grimmond, S.M., Pilarsky, C., Prives, C., Biankin, A. V., Lowe, S.W., 2014. Mutant p53 Drives Pancreatic Cancer Metastasis through Cell-Autonomous PDGF Receptor β Signaling. *Cell* 157, 382–394.
- Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H., 1998. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 58, 4740–4.

- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., Hruban, R.H., 2000. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 60, 2002–6.
- Willis, A., Jung, E.J., Wakefield, T., Chen, X., 2004. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23, 2330–2338.
- Witkiewicz, A.K., McMillan, E.A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W.-C., Mansour, J., Mollaei, M., Wagner, K.-U., Koduru, P., Yopp, A., Choti, M.A., Yeo, C.J., McCue, P., White, M.A., Knudsen, E.S., 2015. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat. Commun.* 6, 6744.
- Yachida, S., Iacobuzio-Donahue, C.A., 2009. The Pathology and Genetics of Metastatic Pancreatic Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133, 413–422.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Iacobuzio-Donahue, C.A., 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114–1117.
- Yamaguchi, J., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Ebata, T., Nagino, M., 2018. Cells of origin of pancreatic neoplasms. *Surg. Today* 48, 9–17.
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A.R., Martin, E.S., Chang, J., Hezel, A.F., Perry, S.R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J.M., Weissleder, R., Wang, Y.A., Chin, L., Cantley, L.C., DePinho, R.A., 2012. Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell* 149, 656–670.
- Yingling, J.M., Datto, M.B., Wong, C., Frederick, J.P., Liberati, N.T., Wang, X.F., 1997. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7019–7028.
- Zhang, S., Wang, C., Huang, H., Jiang, Q., Zhao, D., Tian, Y., Ma, J., Yuan, W., Sun, Y., Che, X., Zhang, J., Chen, H., Zhao, Y., Chu, Y., Zhang, Y., Chen, Y., 2017. Effects of alcohol drinking and smoking on pancreatic ductal adenocarcinoma mortality: A retrospective cohort study consisting of 1783 patients. *Sci. Rep.* 7, 9572.
- Zhang, W., Nandakumar, N., Shi, Y., Manzano, M., Smith, A., Graham, G., Gupta, S., Vietsch, E.E., Laughlin, S.Z., Wadhwa, M., Chetram, M., Joshi, M., Wang, F., Kallakury, B., Toretzky, J., Wellstein, A., Yi, C., 2014. Downstream of Mutant KRAS, the Transcription Regulator YAP Is Essential for Neoplastic Progression to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci. Signal.* 7, ra42–ra42.